
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ –
ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑ –
ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ»

Διευθυντής ΠΜΣ : Καθηγητής ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ανοσοφαινοτυπική προσμέτρηση επιφανειακών δεικτών στην
κύηση»

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΛΟΥΙΖΑΚΗΣ
ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΒΙΟΛΟΓΟΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΣΤΗΣ

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης

ΛΑΡΙΣΑ

Ιούλιος 2021

"Βεβαιώνω ότι η παρούσα διπλωματική εργασία είναι αποτέλεσμα δικής μου δουλειάς και δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής. Στις δημοσιευμένες ή μη δημοσιευμένες πηγές έχω χρησιμοποιήσει εισαγωγικά και όπου απαιτείται έχω παραθέσει τις πηγές τους στο τμήμα της βιβλιογραφίας.

Υπογραφή: "

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:

- | | |
|---------------------------------|---|
| 1^{ος} Εξεταστής | Αλέξανδρος Δαπόντε, Καθηγητή Μαιευτικής
και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας (Επιβλέπων) |
| 2^{ος} Εξεταστής | Δημήτριος Μπόγδανος, Καθηγητή Παθολογίας
και Αυτοάνοσων Νοσημάτων
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας |
| 3^{ος} Εξεταστής | Παναγιώτης Λιάκος, Αναπληρωτής Καθηγητής
Βιοχημείας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας |

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διευθυντή του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών κύριο Αλέξανδρο Δαπόντε καθώς και τον υπεύθυνο καθηγητή της εργασίας μου κύριο Δημήτριο Μπόγδανο για την πολύτιμη υποστήριξη τους καθώς και όλους τους επιστημονικούς συνεργάτες του προγράμματος για τις πολύτιμες γνώσεις και εμπειρίες που με προσέφεραν.

ΛΟΥΙΖΑΚΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

**«Ανοσοφαινοτυπική προσμέτρηση επιφανειακών δεικτών στην
κύηση»**

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΛΟΥΙΖΑΚΗΣ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, 2018

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Επιβλέπων:** Αλέξανδρος Δαπόντε, Καθηγητή Μαιευτικής
και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας (Επιβλέπων)
- Σύμβουλος :** Δημήτριος Μπόγδανος, Καθηγητή Παθολογίας
και Αυτοάνοσων Νοσημάτων
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Μέλος :** Παναγιώτης Λιάκος, Αναπληρωτής Καθηγητής
Βιοχημείας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περίληψη

Στην κύηση το ημι-αλλογενές έμβρυο χρειάζεται να συνυπάρξει μαζί με το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας σε μια κατάσταση ανοχής. Στην καθιέρωση αυτού του περιβάλλοντος σημαντικό ρόλο παίζουν τόσο τα T ρυθμιστικά κύτταρα όσο και τα B ρυθμιστικά κύτταρα. Με την χρήση διάφορων μεθόδων, όπως είναι και η κυτταρομετρία ροής, μπορέσαμε να εξετάσουμε σε βάθος τον φαινότυπο προηγούμενα άγνωστων πληθυσμών κυττάρων του ανοσοποιητικού και να κατανοήσουμε την μεγάλη ετερογένεια που υπάρχει μεταξύ των T και B ρυθμιστικών κυττάρων. Αυτή η ετερογένεια παίζει ρόλο και στην κύηση, και εμφανίζεται εξίσου στην μητρική- εμβρυϊκή διεπαφή και στο περιφερικό αίμα. Διαφορετικοί πληθυσμοί αυτών των κυττάρων εμφανίζουν διαφορετικό φαινότυπο και ιδιότητες. Επιπλέον, ο αριθμός τους ποικίλει κατά την διάρκεια της κύησης και εμφανίζει διακυμάνσεις σε περίπτωση επιπλοκών. Αυτή η παρατήρηση δείχνει ότι διαφορετικοί πληθυσμοί ρυθμιστικών κυττάρων παίζουν ρόλο σε διαφορετικά στάδια της κύησης και ο ρόλος τους στην διατήρηση μιας υγιούς εγκυμοσύνης είναι κρίσιμος, καθώς υποδηλώνεται και σε περιπτώσεις όπου γυναίκες με επιπλοκές στην κύηση εμφανίζουν μειωμένο αριθμό αυτών των κυττάρων. Για αυτό τον λόγο είναι απαραίτητο να κατανοήσουμε πλήρως το μικροπεριβάλλον της μήτρας, και πιο ειδικά την συμπεριφορά του ανοσοποιητικού συστήματος κατά την διάρκεια της κύησης. Σε αυτή την βιβλιογραφική ανασκόπηση, έγινε εστίαση στην συνεισφορά αυτών των κυττάρων και των διάφορων πληθυσμών τους στο μικροπεριβάλλον της μήτρας και τον πιθανό ρόλο τους στην έκβαση της κύησης, καθώς μελετήθηκε ο φαινότυπος, οι μηχανισμοί και η δράση τους.

Λέξεις κλειδιά: T ρυθμιστικά κύτταρα, B ρυθμιστικά κύτταρα, κύηση, προεκλαμψία, αυτόματη αποβολή, εμφύτευση, ανοσιακή ανοχή

Summary

In pregnancy the semi-allogeneic fetus needs to coexist with the mother's immune system in a state of tolerance. Both T-regulatory and B-regulatory cells play an important role in establishing this environment. Using various methods, such as flow cytometry, we were able to examine in depth the phenomenon of the previously unknown population of immune cells and to understand the great heterogeneity that exists between T and B regulatory cells. This heterogeneity plays a role in pregnancy, and occurs equally in the maternal-fetal interface and in the peripheral blood. Different populations of these cells exhibit different phenotypes and properties. In addition, their number varies during pregnancy and varies in case of complications. This observation shows that different populations of regulatory cells play a role in different stages of pregnancy and their role in maintaining a healthy pregnancy is crucial, as is also suggested in cases where women with pregnancy complications have a reduced number of these cells. For this reason it is necessary to fully understand the microenvironment of the decidua, and more specifically the behavior of the immune system during pregnancy. In this review, the focus was on the contribution of these cells and their various populations to the microenvironment of the decidua and their possible role in the outcome of pregnancy, as their phenotype, mechanisms and action were studied.

Key words: T regulatory cells, B regulatory cells, pregnancy, preeclampsia, miscarriage, implantation, immune tolerance

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο 1 (Γενικό μέρος).....	9
1. Εισαγωγή	9
1.1 Η σημασία του ανοσοποιητικού συστήματος στην κύηση.....	9
1.2 Η ανάπτυξη του πλακούντα και η αποφυγή της ανοσιακής απόκρισης έναντι της τροφοβλάστης.....	10
1.3 Η ρύθμιση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος της μητέρας κατά την διάρκεια της κύησης	12
1.3.1 Κύτταρα φυσικοί φονείς (Natural Killer cells)	13
1.3.2 Κύτταρα μυελικής σειράς	14
1.3.3 Τ λεμφοκύτταρα	14
1.3.4 Β λεμφοκύτταρα.....	16
Κεφάλαιο 2 (Ειδικό μέρος).....	18
2. Εισαγωγή	18
2 Τα χαρακτηριστικά των Τ ρυθμιστικών κυττάρων	18
2.1.1 Οι μηχανισμοί ανοσοκαταστολής μέσω των Treg στην κύηση	21
2.2 Τα χαρακτηριστικά των Β ρυθμιστικών κυττάρων	23
2.2.1 Μηχανισμοί των Β ρυθμιστικών κυττάρων στην κύηση	26
Κεφάλαιο 3 29	
3. Σκοπός μελέτης.....	29
Κεφάλαιο 4 30	
4. Μεθοδολογία.....	30
Κεφάλαιο 5 31	
5. Αποτελέσματα.....	31
5 Αποτελέσματα ερευνών για την ρύθμιση των Τ ρυθμιστικών κυττάρων στην κύηση.....	31
5.1 Αποτελέσματα ερευνών για την ρύθμιση των Β ρυθμιστικών κυττάρων στην κύηση.....	41
Κεφάλαιο 6 45	
6 Σύνοψη	45

Κεφάλαιο 1 (Γενικό μέρος)**1. Εισαγωγή****1.1 Η σημασία του ανοσοποιητικού συστήματος στην κύηση**

Σύμφωνα με όσα στοιχεία έχουν μέχρι πρόσφατα δημοσιευθεί σε ερευνητικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί και αφορούν όλα τα στάδια της κύησης μέχρι την επιτυχή της έκβαση, το ανοσοποιητικό σύστημα και η εύρυθμη λειτουργία του διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο. Η σημασία του καταδεικνύεται ιδιαίτερα σε γυναίκες με αλλεργικό άσθμα, αυτοάνοσα νοσήματα και ανοσο-ανεπάρκειες οι οποίες διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο για την κακή έκβαση της επικείμενης κύησης τους. Επίσης, η αλληλεπίδραση του συστήματος φαίνεται να επηρεάζει την γυναίκα και μετά τον τοκετό [1]. Η πρόσφατη εμφάνιση ιών όπως της γρίπης, του κορωνοϊού SARS-CoV2 (COVID-19), και των Ebola και Zika, υπογραμμίζει την αναγκαιότητα της εστίασης στο ανοσοποιητικό σύστημα και κυρίως όσον αφορά την ανάπτυξη εμβολίων για τις εγκύους. Τέλος, οι επιπτώσεις της έκθεσης του ανοσοποιητικού της μητέρας σε μολυσματικούς παράγοντες καθ' όλη την διάρκεια της κύησης επηρεάζουν τόσο την υγεία της γυναίκας όσο και του εμβρύου[3].

Ιδιαίτερη σημασία κατέχουν οι εγγενείς προστατευτικοί μηχανισμοί η οποία αναδεικνύεται τόσο από τον ρόλο ως προστατευτικού φραγμού όσο και από την αντιμικροβιακή τους δράση. Η ισορροπία του μικροβιώματος εντός διάφορων ιστών μπορεί να καθορίσει την διαφορά μεταξύ υγείας και αυτοανοσίας. Οι περισσότεροι από 1 δισεκατομμύριο μικροοργανισμοί που επιβιώνουν στον κόλπο πιστεύεται ότι μεσολαβούν τόσο στις ανοσοπροστατευτικές όσο και στις ανασοδιαμορφωτικές λειτουργίες[4]. Επιπλέον αλλαγές στο κολπικό μικροβίωμα μπορεί να συσχετιστούν με αυξημένο ρίσκο πρόωρου τοκετού. Εκτός από τα βακτήρια που υπάρχουν στην περιοχή του κόλπου, υπάρχουν παράλληλα και ιοί που αλληλεπιδρούν με αυτά και το

τοπικό ανοσοποιητικό σύστημα για την στήριξη της υγείας ή την πρόκληση ασθένειας.

Εκτός από την προστασία και την διατήρηση του φυσιολογικού περιβάλλοντος εντός του κόλπου το ανοσοποιητικό σύστημα παίζει μεγάλο ρόλο και την δημιουργία ενός περιβάλλοντος ιδανικό για την εμφύτευση καθώς και την μετέπειτα πορεία του εμβρύου στην κύηση. Για να επιτευχθεί αυτός ο στόχος θα πρέπει να γίνει σωστή ρύθμιση του συστήματος ώστε να αποφευχθεί η ανοσολογική απόκριση της μητέρας ενάντια στο αναπτυσσόμενο έμβρυο[5].

1.2 Η ανάπτυξη του πλακούντα και η αποφυγή της ανοσιακής απόκρισης έναντι της τροφοβλάστης

Το πιο κρίσιμο χαρακτηριστικό, όσον αφορά την αλληλεπίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τα στάδια της κύησης, είναι ότι το ημι-αλλογενές έμβρυο πρέπει να γίνει πλήρως ανεκτό από το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας. Αυτό το γεγονός παραπέμπει σε ομοιότητα με την μεταμόσχευση οργάνων όπου ένα μόσχευμα θα απορριφθεί από το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς εκτός και αν αυτός λάβει ανοσοκατασταλτικά φάρμακα. Δεδομένου του ότι τα μητρικά κύτταρα έρχονται σε άμεση επαφή με τα κύτταρα του εμβρύου στην μητρική-εμβρυϊκή διεπαφή στον πλακούντα, πιστεύεται ότι τα μητρικά κύτταρα του ανοσοποιητικού στον πλακούντα δεν προσβάλλουν τα εμβρυϊκά (τροφοβλάστες) λόγω του ανοσολογικά ανεκτικού μικροπεριβάλλοντος που δημιουργείται από τα ειδικά ανοσοκύτταρα[6].

Η κύρια λειτουργία του πλακούντα είναι να παρέχει οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Στο πρώτο τρίμηνο, τα θρεπτικά παρέχονται κυρίως από τους αδένες της μήτρας σε ένα περιβάλλον υποξίας καθώς δεν έχει καθιερωθεί μια ενεργή κυκλοφορία αίματος από την μητέρα ακόμα. Μόλις γίνει αυτή η παροχή στον πλακούντα, περίπου μεταξύ 11-12^{ης} εβδομάδας της κύησης, το οξυγόνο και τα θρεπτικά μετακινούνται διαμέσου ενός πολύ λεπτού τοιχώματος εμβρυϊκών κυττάρων. Από την στιγμή που το έμβρυο είναι ημι-αλλογενές, καθώς κληρονομεί τόσο μητρικά όσο και πατρικά αντιγόνα, η εμβρυϊκή τροφοβλάστη μπορεί να αναγνωριστεί κάλλιστα ως ένα ξένο σώμα από τα ανοσοκύτταρα της μητέρας. Τα

κυριότερα είδη της τροφοβλάστης που μπορούν να αναγνωριστούν είναι τα εξής: κυτταροτροφοβλάστη (CTB), συνκυτταροτροφοβλάστη (SCTB) και τον εξωτερικό τροφοβλάστη (EVT). Στην αρχή του πρώτου τριμήνου η εμβρυϊκή – μητρική διεπαφή αποτελείται από τα μητρικά παρεγχυματικά κύτταρα της μήτρας και τα εμβρυϊκά SCTs. Αργότερα στην κύηση η διεπαφή εκπροσωπείται κυρίως από μητρικά κύτταρα της μήτρας και τα EVTs όπου γίνεται μια διάκριση μεταξύ βασικού φθαρτού (decidua basalis) και τοιχικού ενδομήτριου (decidua peritalis). Πολύ μεγάλη σημασία έχει και ένα δεύτερο σημείο διεπαφής που σχηματίζεται μεταξύ μητέρας και εμβρύου όταν πραγματοποιηθεί η κυκλοφορία του αίματος μεταξύ τους. Το μητρικό περιφερικό αίμα τότε έρχεται σε επαφή με το στρώμα των SCTs, τις εμβρυϊκές λάχνες. Από την στιγμή που θα πραγματοποιηθούν οι παραπάνω συνδέσεις είναι σημαντικό τα κύτταρα της μητρικής ανοσίας να διατηρήσουν ένα περιβάλλον ισορροπίας μεταξύ, ανοχής του ημι-αλλογενούς εμβρύου και παράλληλα να μπορούν να παρέχουν μια ισχυρή ανοσιακή απόκριση σε περίπτωση μόλυνσης από παθογόνα[6].

Τα κλασσικά μόρια του ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου (HLA) τάξης I, HLA-A, -B, -C, είναι συνήθως παρόντα σε σχεδόν όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα του σώματος και παρουσιάζουν ενδοκυτταρικά αντιγόνα στα T λεμφοκύτταρα. Τα μη κλασσικά μόρια HLA υπάρχουν επιλεκτικά και έχουν περιγραφεί πρώτα στην τροφοβλάστη και τον πλακούντα και αργότερα σε άλλους ιστούς. HLA τάξης II εκφράζονται κυρίως από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs), συμπεριλαμβανομένων δένδριτικά κύτταρα (DCs), μακροφάγα και B κύτταρα. Από την στιγμή που το έμβρυο κληρονομεί τα μισά γονίδια από τον πατέρα, κληρονομεί και τα μισά από τα πατρικά HLA αλληλόμορφα, τα οποία δυνητικά μπορούν να αναγνωριστούν ως ξένο σώμα από το μητρικό ανοσοποιητικό σύστημα[7].

Ένας τρόπος για την τροφοβλάστη να αποφύγει την αναγνώριση από το μητρικό ανοσοποιητικό σύστημα είναι η έλλειψη των πολυμορφικών μορίων HLA-A, -B, και HLA τάξης II στην επιφάνεια των κυττάρων τους, παρόλα' αυτά τα EVTs εκφράζουν πολυμορφικά HLA-C μόρια. Η κανονική λειτουργία αυτών των μορίων είναι να παρουσιάζουν μια μεγάλη ποικιλία πεπτιδίων που προέρχονται από παθογόνα στα τοπικά CD8 T κύτταρα[7]. Αφού τα HLA-C μόρια είναι πολυμορφικά η παρουσία τους στην τροφοβλάστη μπορεί επίσης να οδηγήσει σε άλλο-αναγνώριση του πατρικού κληρονομούμενου HLA-C από τα μητρικά T κύτταρα. Τα EVTs πιθανόν να βοηθούν στην δημιουργία ισορροπίας στο τοπικό ανοσοποιητικό περιβάλλον της

μητέρας προς την δημιουργία ανοχής με την έκφραση των μη κλασσικών HLA-E και HLA-G και πιθανόν και HLA-F. Οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την ύπαρξη ή απουσία των συγκεκριμένων μορίων HLA τάξης I στην τροφοβλάστη δεν έχουν μελετηθεί πλήρως. Η έκφραση των HLA μορίων στην τροφοβλάστη την επιτρέπει να δραπετεύσει από τον έλεγχο των NK κυττάρων. Τα HLA-G περιγράφηκαν πρώτα στα CTB κύτταρα και έχειδειχθεί ότι μπορούν να προκαλέσουν ανοσιακή ανοχή. Τα HLA-E επίσης βοηθούν με τον ίδιο τρόπο μέσω της σύνδεσης με τα NK κύτταρα, των οποίων την λειτουργία την καταστέλλουν. Τα SCTs, τα οποία βρίσκονται σε άμεση επαφή με την κυκλοφορία της μητέρας δεν εκφράζουν κανένα HLA μόριο, το οποίο μπορεί να τα οδηγούσε σε εξόντωση τους από τα NK κύτταρα. Για την εξουδετέρωση από τα NK ένας ενεργοποιητής-σύνδεσμος πρέπει να υπάρχει στο κύτταρο-στόχο, που πιθανότατα λείπει από την τροφοβλάστη[8].

Η τροφοβλάστη επίσης εκφράζει διάφορους ανασταλτικούς υποδοχείς οι οποίοι μειώνουν την ανοσοαντιδραστικότητα, συμπεριλαμβανομένων των (Programmed Death Ligand) PD-L1, PD-L2, CD200, FasL μερικοί εκ των οποίων εκφράζονται με διαφορετικό τρόπο κατά την διάρκεια της κύησης[9]. Είναι επίσης γνωστό το γεγονός ότι εκφράζονται και διάφοροι διαλυτοί παράγοντες με ανοσορρυθμιστική δράση, όπως το διαλυτό HLA-G (sHLA-G), transforming growth factor-beta (TGF-β), και ινδολαμίνη 2,3-διοξυγενάση (IDO)[10]. Καθώς η IDO προκαλεί τοπική έλλειψη τρυπτοφάνης, η οποία αποτελεί σημαντικό αμινοξύ που χρειάζεται για την ενεργοποίηση των T κυττάρων, αυξημένα επίπεδα IDO προκαλούν καταστολή της ενεργοποίησης των T κυττάρων. Πρόσφατα, ο ρόλος των γαλεκτίνων στην ανθρώπινη τροφοβλάστη εξετάστηκε και έδειξε ότι μπορεί να επηρεάσει έναν μεγάλο αριθμό ρυθμιστικών μηχανισμών, όπως η απόπτωση των T κυττάρων και η ανάπτυξη τους[11].

1.3 Η ρύθμιση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος της μητέρας κατά την διάρκεια της κύησης

Είναι σημαντικό να αναφερθεί σε αυτό το σημείο ότι η κύηση δεν είναι μια κατάσταση γενικευμένης ανοσοκαταστολής αλλά περισσότερο μια τοπική και

συστημική ανοσο-ρύθμιση, κατά την οποία η εγκυμονούσες γυναίκες έχουν παρουσιάσει αυξημένη ευαισθησία σε ασθένειες όπως η κοινή γρίπη (influenza), ιλαρά, ηπατίτιδα Ε και ιό του απλού έρπητα[12]. Η στενή ρύθμιση και διαμόρφωση του ανοσοποιητικού συστήματος είναι απαραίτητη, καθώς τόσο φλεγμονώδη όσο και αντιφλεγμονώδη σήματα είναι αναγκαία για την επιτυχημένη έκβαση της. Πιστεύεται ότι αίτια που αφορούν το ανοσοποιητικό σύστημα εξηγούν πολλές ιδιοπαθείς περιπτώσεις υπογονιμότητας. Ο ποικίλος συνδυασμός των ορμονών κατά την πορεία της κύησης είναι κρίσιμος, καθώς διαμορφώνει την στρατολόγηση και μετριάξει την παρουσία ορισμένων κυττάρων τόσο της έμφυτης όσο και της προσαρμοστικής ανοσίας στο σημείο της μητρικής-εμβρυϊκής διεπαφής. Συγκεκριμένα η οιστραδιόλη, προγεστερόνη και η ανθρώπινη γοναδοτροπική ορμόνη αποτελούν τις κύριες ορμόνες στην ρύθμιση αυτή, καταστέλλοντας καταστροφικές ανοσιακές αποκρίσεις και προάγοντας μονοπάτια ανοσο-ανοχής, όπως η μεσολαβούμενη από την ανθρώπινη γοναδοτροπική ορμόνη μείωση της κυτταροτοξικής ικανότητας των περιφερικών NK κυττάρων των εγκύων[13].

1.3.1 Κύτταρα φυσικοί φονείς (Natural Killer cells)

Τα NK κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην διάρκεια της εγκυμοσύνης, προστατεύοντας την μητέρα και το έμβρυο. Αντιπροσωπεύουν ένα μεγάλο ποσοστό των λευκοκυττάρων της μήτρας και υπάρχει αύξηση των τοπικών NK τα οποία χαρακτηρίζονται από τον φαινότυπο CD56^{bright} και CD16- [14]. Τα κύτταρα με αυτό τον φαινότυπο επιτελούν ανοσορυθμιστικές λειτουργίες σε άλλους ιστούς αλλά στην μήτρα παίζουν εξέχοντα ρόλο στην ανοσοκαταστολή και επιτυχή καθιέρωση της εγκυμοσύνης. Παράλληλα, τα NK παρουσιάζουν αυξημένη σχετική έκφραση ανασταλτικών υποδοχέων και συντελούν, στην διαμόρφωση των αγγείων της μήτρας καθώς και στην μετανάστευση και διείσδυση της τροφοβλάστης. Επιπλέον, τα τοπικά NK κύτταρα αντιδρούν με τα ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα HLA-G, -C προκαλώντας καταστολή των φλεγμονωδών αντιδράσεων. Αυτό έχει μεγάλη σημασία για τον ρόλο τους στην κύηση καθώς ο μη κλασσικός πολυμορφικός δείκτης HLA-G εκφράζεται στα εξωτερικά κύτταρα της τροφοβλάστης[15].

1.3.2 Κύτταρα μυελικής σειράς

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν κύτταρα όπως τα μακροφάγα, δενδριτικά (DC), και μαστικά κύτταρα τα οποία παίζουν ρόλο στην εμφύτευση και την αναδιαμόρφωση της τροφοβλάστης. Τα επίπεδα των μακροφάγων ρυθμίζονται καθ' όλα τα στάδια της εγκυμοσύνης. Κατά την διάρκεια της αναδιαμόρφωσης των ιστών και της αγγειογένεσης παρατηρείται αύξηση της συχνότητας των M2 μακροφάγων[16]. Τα μακροφάγα είναι επίσης ικανά να ρυθμίζουν τα ορμονικά επίπεδα, καθώς αποσυνθέτουν την πλεονάζουσα γοναδοτροπική ορμόνη και είναι επίσης υπεύθυνα για την αντιμετώπιση των παθογόνων μικροοργανισμών στην μήτρα, επομένως παρουσιάζουν τόσο φλεγμονώδη όσο και αντιφλεγμονώδη λειτουργία. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι ορμονικές αλλαγές επηρεάζουν την παρουσία και τον φαινότυπο των περιφερικών μονοκυττάρων, τα οποία έχουν ως ρόλο την υποβοήθηση της εμφύτευσης της βλαστοκύστης και παράλληλα τον τερματισμό της κύησης[13]. Επιπλέον, τα δενδριτικά κύτταρα διατηρούνται κυρίως σε έναν πιο ανώριμο φαινότυπο με ρυθμιστικές ιδιότητες. Τα μαστικά κύτταρα είναι παρόντα στην μητρική-εμβρυϊκή διεπαφή και ευνοούν την εμφύτευση, αγγειογενεση και την διαμόρφωση των ιστών, ενώ βρίσκονται σε μια μη ενεργή κατάσταση και παρουσιάζουν διαφορετικό φαινότυπο από τα κλασσικά περιφερικά κύτταρα[13].

1.3.3 Τ λεμφοκύτταρα

Τα Τ κύτταρα επιτελούν τον μεγαλύτερο βαθμό ανοσορύθμισης κατά την κύηση. Ερευνητικές μελέτες σε πειραματικά μοντέλα ποντικών έχουν δείξει ότι η μείωση του αριθμού των Τ κυττάρων οδήγησε σε μη σχηματισμό του πλακούντα, ενώ η μεταφορά σε ποντικούς με έλλειψη Τ κυττάρων αποτρέπει την αποβολή[17].

Τα Τ κύτταρα μπορούν να χαρακτηριστούν ανάλογα με τα πρωτεϊνικά συστατικά των Τ κυτταρικών υποδοχέων (TCR), οι οποίοι αποτελούνται από δυο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, α και β, που βρίσκονται στην πλειονότητα των Τ κυττάρων και επίσης γ και δ αλυσίδων. Σε πειραματικά μοντέλα, γδ Τ κύτταρα στην περιοχή της μήτρας φαίνεται να έχουν ρόλο στην αποφυγή αποβολών αμέσως μετά την εμφύτευση, ενώ η παραγωγή IL-10 και TGFβ2 αποτρέπει την αποτυχημένη έκβαση της κύησης[18].

Στην χρονική περίοδο της εμφύτευσης τα Τ κύτταρα αποτελούν περίπου το 32% των συνολικών κυττάρων του ανοσοποιητικού ενώ στην συνέχεια μειώνονται στο 20% στην πρώιμη φάση της εγκυμοσύνης. Στο ενδομήτριο παρατηρείται αυξημένη αναλογία CD4/CD8 κυττάρων σε γυναίκες που εμφανίζουν ανεξήγητες επαναλαμβανόμενες αποβολές (URA), σε σχέση με γόνιμες γυναίκες, είτε λόγω μείωσης των CD8 Τ κυττάρων, είτε λόγω αύξηση αντίστοιχα των CD4 κυττάρων. Η έκφραση του CD25 από τα Τ κύτταρα στο πρώτο τρίμηνο υποδηλώνει ότι τα κύτταρα αυτά είναι ενεργοποιημένα. Η αυξημένη συχνότητα των CD25 CD4 Τ κυττάρων στο πρώτο τρίμηνο σε γυναίκες που εμφανίζουν αυθόρμητες αποβολές, σε σύγκριση με δείγματα από επιλεγμένους τερματισμούς κύησης και αποβολών λόγω χρωμοσωμικά ανώμαλων εμβρύων δείχνει ότι Τ κύτταρα είναι ενεργά στην περιοχή της μήτρας σε περιπτώσεις αυτόματων αποβολών και πιο συγκεκριμένα σε URA με χρωμοσωμικά φυσιολογικά έμβρυα[19].

Η δράση των Τ κυττάρων συντελείται από τις κυτταροκίνες που παράγουν, εκ των οποίων αρκετές μπορούν να προάγουν την διατήρηση του πλακούντα. Τα ανθρώπινα CD4 Τ κύτταρα μπορούν να ταξινομηθούν σε Th1 και Th2 κύτταρα με βάση τις παραγόμενες κυτταροκίνες. Τα πρώτα παράγουν ιντερλευκίνη 2 (IL-2), παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF) α, και ιντερφερόνη (IFN)γ, και είναι οι κύριοι ενεργοποιητές της φαγοκυτταρικής άμυνας, που είναι κυρίως χρήσιμη ενάντια σε μόλυνση από ενδοκυτταρικά παράσιτα. Από την άλλη τα Th2 παράγουν IL-4, IL-5, IL-13 και IL-10, οι οποίες καταστέλλουν πολλές μακροφαγικές λειτουργίες. Τα συγκεκριμένα κύτταρα είναι υπεύθυνα για φαγοκυτταρικά ανεξάρτητες αμυντικές διαδικασίες. Υπάρχει επίσης και ο πληθυσμός των Th3 τα οποία παράγουν TGFβ και φαίνεται ότι μειώνονται στην περιοχή της διεπαφής κοντά στον πλακούντα σε 59% των ασθενών με URA[17].

Όσον αφορά τα δραστικά Τ κύτταρα η μετατροπή της αναλογίας Th1/Th2 αποτελεί σημαντική ένδειξη για την ευνοϊκή έκβαση της κύησης αλλά αποτελεί ακόμα πεδίο

αμφιλεγόμενων απόψεων. Σε πειραματικά μοντέλα όπου έγινε αφαίρεση των σχετικών με τα Th2 κυτταροκινών φάνηκε ότι η μείωση ή η αύξηση αυτής της αναλογίας αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη για την πορεία της κύησης χωρίς να αποτελεί την αιτία που ευθύνεται για το τελικό αποτέλεσμα της κύησης[18].

Παρόλα αυτά συσχέτιση της παραγωγής Th1 κυττάρων, ειδικά για πατρικά αντιγόνα, με μη επαρκή παραγωγή T ρυθμιστικών κυττάρων (Treg) προκάλεσε αποβολές σε μοντέλα ποντικών. Σε αντίθεση, τα γδ T κύτταρα είναι αυξημένα κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης και ρυθμίζονται από ορμόνες, έχοντας κατασταλτικές ιδιότητες[17].

Ο πληθυσμός με την μεγαλύτερη σημασία για την ευνοϊκή έκβαση της κύησης αποτελεί τα T ρυθμιστικά (Treg) κύτταρα τα οποία ρυθμίζονται τόσο από ορμονικές αλλαγές όσο και από αλλοαντιγονική έκθεση, και θα αναλυθούν περαιτέρω στο ειδικό μέρος.

1.3.4 B λεμφοκύτταρα

Ο ρόλος των B κυττάρων κατά την εγκυμοσύνη έχει μελετηθεί λιγότερο σε σχέση με τα υπόλοιπα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, παρόλα αυτά συχνότητες και λειτουργίες ορισμένων B κυττάρων έχουν συσχετιστεί με επιπλοκές στην εγκυμοσύνη. Ανέκαθεν θεωρούνταν ως ένα εργοστάσιο παραγωγής αντισωμάτων, ενώ τώρα γνωρίζουμε ότι έχουν και πολλές άλλες λειτουργίες συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής κυτταροκινών και ρύθμισης της δράσης των T κυττάρων[20]. Η ανάπτυξη και η ωρίμανση των B κυττάρων είναι μια διαδικασία που ξεκινάει από την 7^η ως την 8^η εβδομάδα της κύησης στο εμβρυϊκό συκώτι και συνεχίζεται στον μυελό μετά την 17-18^η εβδομάδα, οδηγώντας στην παραγωγή διαφορετικών πληθυσμών B κυττάρων στο περιφερικό αίμα που περιλαμβάνει αδιαφοροποίητα, μεταβατικά B κύτταρα, τα οποία παράγουν IgM, IgD και CD27 στην μεμβράνη τους, ώριμα B κύτταρα και πλασματοκύτταρα[21]. Κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης, για την αποφυγή καταστροφικών αντιδράσεων, κυτταρικές αποκρίσεις πιστεύεται ότι αναστέλλονται από τις αυξανόμενες χυμικές αποκρίσεις.

Η μητρική παραγωγή αντισωμάτων από τα B κύτταρα έχει αποδειχθεί ότι είναι παράλληλα προστατευτική αλλά και επιβλαβής για την κύηση σε μερικές

περιπτώσεις. Μπορούν να παραχθούν αντισώματα ειδικά για τα πατρικά αντιγόνα, όπως ασύμμετρα αντισώματα που δεσμεύουν τα πατρικά αντιγόνα αλλά δεν παράγουν αποκρίσεις εναντίον τους. Από την άλλη, η παραγωγή ανοσοσφαιρινών είναι σημαντική για την προστασία εναντίον μολύνσεων τόσο για την μητέρα όσο και για το έμβryo. Παρόλα αυτά εκτός από τα προστατευτικά αντισώματα, παραγωγή αυτό-αντισωμάτων μπορεί να προκληθεί μετά από κάποια λοίμωξη πριν ή και κατά την εγκυμοσύνη, όπως τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα, τα οποία μπορεί να προκαλέσουν μετέπειτα προβλήματα[17]. Οι ορμόνες της εγκυμοσύνης επίσης ρυθμίζουν τον πληθυσμό των B κυττάρων και την παραγωγή των αντισωμάτων, των οποίων η απόκριση σε μιτογόνα και μολυσματικούς παράγοντες συνήθως μειώνεται. Η εμβρυϊκή τροφοβλάστη ρυθμίζει θετικά την παραγωγή B κυττάρων που παράγουν IL-10, τα οποία ανταποκρίνονται κυρίως στην γοναδοτροπική ορμόνη παρά στα οιστρογόνα και στην προγεστερόνη.

Γενικά τα μητρικά B κύτταρα μειώνονται κατά την πορεία της κύησης, καθώς έχουμε μείωση των ανώριμων B κυττάρων στο μυελό εγκύων ποντικών ενώ παράλληλα μικρή αύξηση στα ώριμα B κύτταρα. Αυτή η ρύθμιση συνοδεύεται από μια αύξηση σε διαλυτά μόρια IgA, IgM, IgG3. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι η άλφα εμβρυοπρωτεΐνη σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις στο έμβryo μπορεί να προκαλέσει απόπτωση B κυττάρων, εμποδίζοντας έτσι μητρικά κύτταρα να φτάσουν σε αυτό[22]. Σε υγιείς εγκυμονούσες οι απόλυτοι αριθμοί των B κυττάρων στο περιφερικό αίμα μειώνονται κατά το 3^ο τρίμηνο της εγκυμοσύνης. Επίσης υπάρχει παρουσία B κυττάρων στο αμνιακό υγρό σε αρχικές φάσεις της κύησης, με την επιπρόσθετη αυξημένη συχνότητα των μη διαφοροποιημένων B κυττάρων και μείωση στην συχνότητα μεταβατικών και B ρυθμιστικών (Breg) κυττάρων[17].

Κεφάλαιο 2 (Ειδικό μέρος)

2. Εισαγωγή

2 Τα χαρακτηριστικά των T ρυθμιστικών κυττάρων

Όπως αναφέρθηκε το ανοσοποιητικό σύστημα έχει αναπτύξει μηχανισμούς με τους οποίους μπορεί να προστατεύσει τον οργανισμό από οποιαδήποτε μόλυνση. Ένας πολύ σημαντικός μηχανισμός αποτελεί ο διαχωρισμός του εαυτού από τα ξένα αντιγόνα, διατηρώντας έτσι μια κατάσταση ανοχής ως προς τα αυτό-αντιγόνα. Η περιφερική αυτό-ανοχή και η ομοιόσταση διατηρούνται σε έναν μεγάλο βαθμό από τα T ρυθμιστικά (Treg) κύτταρα[23].

Τα T ρυθμιστικά κύτταρα αποτελούν ένα μικρό ποσοστό γύρω στο 5-15% των περιφερικών CD4 T κυττάρων τόσο σε ποντικούς όσο και στους ανθρώπους. Από το 1970 οι Gershon και Kondo παρουσίασαν την ιδέα ότι θυμικά λεμφοκύτταρα, τα ρυθμιστικά, ήταν ικανά να καταστέλλουν ανοσιακές αποκρίσεις. Η έρευνα για τα συγκεκριμένα κύτταρα περιπλέχτηκε καθώς ενώ ο φαινότυπος τους ήταν όμοιος με άλλα κύτταρα, είχαν διαφορετικούς μηχανισμούς με τους οποίους δρούσαν (βασισμένους σε διακυτταρικές επαφές ή την έκκριση ανασταλτικών παραγόντων και κυτταροκινών), υπήρχαν κενά στην κατανόηση της ανάπτυξης τους και στην δυσκολία δημιουργίας καθαρών κλώνων για λεπτομερείς in vitro αναλύσεις. Στο τέλος του 1990 έρευνες στα Treg ξεκίνησαν όταν ο Sakaguchi και συνεργάτες ανακάλυψαν την επιφανειακή έκφραση του υποδοχέα ιντερλευκίνης 2 (IL-2) (CD25) στα CD4 T κύτταρα σαν δείκτη κατασταλτικής ικανότητας[23].

Μερικά χρόνια αργότερα ανακαλύφθηκε το κύριο γονίδιο για την ανάπτυξη και την λειτουργία των Treg, που οδηγεί στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα, forkhead boxP3 (Foxp3). Η σημασία αυτού του γονιδίου για την ομαλή λειτουργία των κυττάρων χαρακτηρίστηκε ενδελεχώς μετά από knock-out έρευνες σε πειραματικά μοντέλα ποντικών, οι οποίες έδειξαν ότι οφείλεται για την πρόκληση συνδρόμου IPEX, το οποίο χαρακτηρίζεται από διαβήτη, αιμολυτική αναιμία,

δερματίτιδα, σπληνομεγαλία, λεμφαδενοπάθεια και καταρράκτη κυτταροκινών. Ο παράγοντας Foxp3 δεν έχει να κάνει μόνο με την οντο-γένεση των Treg αλλά και με την κατασταλτική τους ικανότητα η οποία είναι άμεσα συνδεδεμένη με τα επίπεδα παραγωγής του Foxp3, απουσία του αλληλόμορφου σε ώριμα Treg οδήγησε σε απώλεια της λειτουργίας τους, των επιφανειακών δεικτών και την υιοθέτηση χαρακτηριστικών T δραστικών κυττάρων [25].

Με βάση αυτές τις έρευνες η έκφραση του CD25 στην επιφάνεια του κυττάρου καθώς κι η παρουσία ενδοκυτταρικά του μεταγραφικού παράγοντα Foxp3 έγιναν τα κύρια χαρακτηριστικά των πληθυσμών Treg. Η αμοιβαία έκφραση τους συνήθως χρησιμοποιείται σε πολλές ερευνητικές διαδικασίες.

- **Υποπληθυσμοί T ρυθμιστικών κυττάρων**

Τα Treg βρίσκονται σε όλο το σώμα όπου ρυθμίζουν τις κυτταρικές δραστηριότητες τόσο του έμφυτου όσο και του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού. Τα T ρυθμιστικά κύτταρα, και κυρίως τα CD4, μπορούν να διαχωριστούν σε δύο διακριτές κατηγορίες ανάλογα με τις μοναδικές λειτουργίες τους και τις κατασταλτικές ιδιότητες τους. Οι δυο μεγάλες κατηγορίες στις οποίες χωρίζονται τα T ρυθμιστικά ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο διαφοροποιούνται είναι:

- 1 Θυμικά T ρυθμιστικά (tTreg), αν προέρχονται από τον θύμο αδένα
- 2 Περιφερικά T ρυθμιστικά (iTreg), αν αναπτύχθηκαν στην κυκλοφορία[26]

Επιπλέον, όσον αφορά τα iTregs υπάρχουν δύο διαφορετικές ομάδες στις οποίες ανήκουν ανάλογα με την ανοσοκατασταλτική τους δράση, τα T ρυθμιστικά που παράγουν IL-10 και τα αντίστοιχα TGFβ-κύτταρα (Th3). Ακόμα δεν είναι πλήρως ξεκάθαρο αν τα περιφερικά T ρυθμιστικά προέρχονται από μια μοναδική κυτταρική σειρά ή μπορούν να προέλθουν από όλα τα τυπικά T κύτταρα[27].

Και στις δυο μεγάλες ομάδες παρατηρείται αυξημένη έκφραση του επιφανειακού αντιγόνου CD25, του μεταγραφικού παράγοντα Foxp3, κυτταροτοξική δράση σχετιζόμενη με την πρωτεΐνη 4 T λεμφοκυττάρων (CTLA4), και του υποδοχέα που

σχετίζεται με παράγοντα νέκρωσης όγκου που προκαλείται από γλυκοκορτικοειδή (GITR). Τα περιφερικά Treg φαίνεται να παράγουν μικρότερες ποσότητες πρωτεΐνης προγραμματισμένου θανάτου 1 (PD-1), CD73, μεταγραφικού παράγοντα Helios και επιφανειακού αντιγόνου (Nrp1). Οι δύο τελευταίοι δείκτες έχουν προταθεί ως δείκτες για τον διαχωρισμό των δύο υποομάδων κυττάρων, αλλά ακόμα η ειδικότητα τους είναι υπό μελέτη[28-29].

Μελέτες σε ποντικούς έχουν δείξει ότι ο δείκτης GITR συμμετέχει στην παραγωγή και ωρίμανση των Foxp3 tTreg και είναι υποψήφιος ως δείκτης αναφοράς ενεργών κυττάρων Treg. Επιπρόσθετα, μαζί με τους παραπάνω δείκτες, η έκφραση των ενζύμων αποδόμησης ATP CD39 και CD73 στην επιφάνεια των Treg έχει αρχίσει να αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο ως δείκτης που μπορεί να σχετίζεται με την ανοσοκατασταλτική ικανότητα των κυττάρων μαζί με την έκφραση της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης LAG3[29].

Τα CD4 CD25 tTreg αναπτύσσονται στον θύμο αδένα από πρόδρομα CD4 κύτταρα. Η εξέλιξη τους σε ρυθμιστικά ή συμβατικά CD4 T κύτταρα από τα πρόδρομα T εξαρτάται από την συγγένεια του TCR υποδοχέα τους με τα αυτό-αντιγόνα. Χαμηλή συγγένεια οδηγεί σε θετική επιλογή και παραγωγή συμβατικών T κυττάρων, ενώ μέτρια συγγένεια οδηγεί σε δημιουργία CD4 CD25 Treg. Η ανοσοκαταστολή για να ενεργοποιηθεί προϋποθέτει την σύνδεση του TCR. Όταν έχουμε ενεργοποίηση, η ανοσοκαταστολή από τα Treg είναι ανεξάρτητη από την αντιγονική ειδικότητα. Αντίστροφα, η καταστολή των δραστικών T κυττάρων (Teff) βασίζεται κυρίως στην επαφή των κυττάρων και είναι ανεξάρτητη με τις κατασταλτικές κυτταροκίνες. Το αποτέλεσμα της καταστολής από τα Treg είναι μείωση του αριθμού των T δραστικών κυττάρων και αλλαγή της δραστηριότητάς τους και κίνησης στην κυκλοφορία.

Τα περιφερικά (iTreg) ρυθμιστικά κύτταρα εφαρμόζουν την κατασταλτική τους ιδιότητα κυρίως μέσω της έκκρισης κυτταροκινών όπως η IL-10 και TGFβ, οι οποίες μειώνουν την δράση των δενδριτικών κυττάρων (DCs) να παρουσιάζουν αντιγόνα.

Σε αντίθεση με τα περιφερικά και τα θυμικά ρυθμιστικά κύτταρα οι υποπληθυσμοί των Tr1 και Th3 κυττάρων δεν εκφράζουν τον παράγοντα-Foxp3[30].

2.1.1 Οι μηχανισμοί ανοσοκαταστολής μέσω των Treg στην κύηση

Η ανοχή στην κύηση αποτελεί μια κατάσταση ισορροπίας μεταξύ κλωνικής διαγραφής ή απενεργοποίησης άλλο-δραστικών κυττάρων και ανοσιακής καταστολής μεσολαβούμενη από ρυθμιστικούς υποπληθυσμούς κυττάρων οι οποίοι ανήκουν τόσο στο έμφυτο όσο και στο προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα, όπως τα δενδριτικά που προάγουν την ανοχή, τα ενεργοποιημένα μακροφάγα M2, τα μητρικά NK κύτταρα, καθώς και τα CD4 και CD8 T ρυθμιστικών κυττάρων και τα B ρυθμιστικά κύτταρα. Όλα μαζί δημιουργούν ένα δίκτυο εξασφάλισης της ευνοϊκής έκβασης της κύησης[31].

Τα T ρυθμιστικά κύτταρα φαίνεται ότι στρατολογούνται στην μήτρα κατά την εμφύτευση και την πρώιμη φάση της εγκυμοσύνης από χυμοκίνες όπως η CCL1, CCL4, CCL17 και CCL22. Σε ποντικούς, ο υποδοχέας χυμοκίνης CCR5 αναγνωρίζει την CCL4 και εκφράζεται από το 70% των CD4 CD25 Treg, ενώ η αλληλεπίδραση του CCR8 με τον CCL1 έχει δείξει ότι ενισχύει την ανοσοκατασταλτική δράση των Treg με την προαγωγή της έκφρασης του Foxp3 και την παραγωγή των IL-10, TGFβ και γρανζύμης B[32].

Όπως ειπώθηκε και προηγουμένως τα κύτταρα της εμβρυϊκής τροφοβλάστης παράγουν και εκκρίνουν μόρια τα οποία προάγουν την ανοσοκαταστολή. Όπως έχει παρατηρηθεί και στον καρκίνο, η μειωμένη έκφραση των HLA πολυμορφικών μορίων μαζί με την έκφραση των μη κλασσικών HLA τάξης 1b, τα οποία παρουσιάζουν ελάχιστους πολυμορφισμούς, προστατεύουν την τροφοβλάστη από την αναγνώριση και κυτταροτοξική απόκριση από τα μητρικά Teff και NK κύτταρα[31].

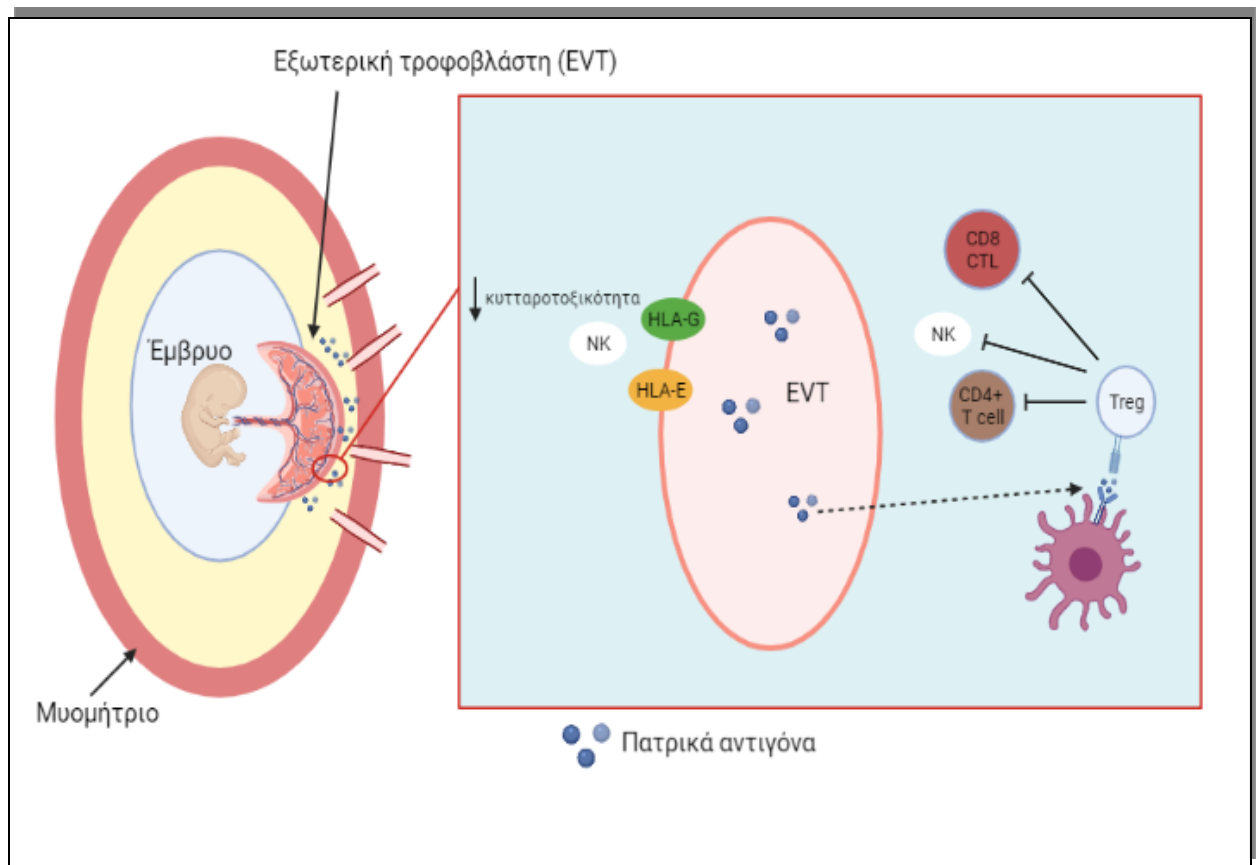
Άλλοι ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες που εκφράζονται από την τροφοβλάστη είναι επίσης οι PD-L1, τα μέλη της οικογένειας TNF FasL, παράγοντες νέκρωσης όγκου (CD235), και IDO. Τα μόρια αυτά συμμετέχουν και στην ομοιοστάση των T κυττάρων μέσω της πρόκλησης απόπτωσης των άλλο-αντιδραστικών Teff κυττάρων. Επιπλέον, εκκρίνονται η IL-10 και ο TGFβ που βοηθούν στην διαφοροποίηση και στρατολόγηση των Treg, ενώ παράλληλα η IL-10 έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στην έκφραση του διαλυτού μορίου HLA-G, άρα και στην ισορροπία των Treg[33].

Οι λειτουργίες των Treg στην κύηση είναι παρόμοιες με αυτές στο μικροπεριβάλλον ενός καρκίνου, στο οποίο τα Treg ρυθμίζουν τα υπόλοιπα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Αρχικά περιορίζουν την δράση των Teff κυττάρων με την έκφραση

των CD25, CTLA-4, και του μονοπατιού PD-L1 καθώς και με την έκκριση IL-10 και TGFβ που προάγουν την απόπτωση και την καταστολή της κυτταροτοξικότητας των υπόλοιπων κυττάρων[34].

Τα δενδριτικά DC κύτταρα είναι κεντρικά για την ενεργοποίηση και την διαφοροποίηση των T κυττάρων μέσω της παρουσίας αντιγόνων και παρέχοντας τα διεγερτικά σήματα. Τα DC που παράγονται στα πρώτα στάδια της κύησης, κατά τον σχηματισμό της τροφοβλάστης, παράγουν IL-10 και ενισχύουν τον σχηματισμό Treg. Έπειτα τα Treg προάγουν τον σχηματισμό αντιφλεγμονωδών ενεργοποιημένων μακροφάγων M2, μέσω της IL-10. Επιπλέον τα Treg παράγουν την αίμη οξυγενάσης 1 (HO-1), η οποία καθλώνει τα DC κύτταρα σε μια ανώριμη κατάσταση στην οποία παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες IL-10 ενισχύοντας έτσι περαιτέρω την δράση τους. Από την πλευρά τους, τα DC εκκρίνουν IDO και TGFβ ενώ έρχονται σε επαφή και με τον υποδοχέα CTLA-4 των Treg, προάγοντας τον σχηματισμό τους επηρεάζοντας την ισορροπία των Treg/Teff[31].

Υπάρχουν επιπλέον ενδείξεις ότι τα Treg είναι υπεύθυνα για τον φαινότυπο των NK κυττάρων στην περιοχή της μήτρας. Μέσω της TGFβ εξαρτώμενης αλληλεπίδρασης τους τα Treg ρυθμίζουν την κυτταροτοξικότητα των NK και καταστέλλουν την απελευθέρωση της IL-15 από τα DCs που είναι σημαντική για την παραγωγή τους ενώ παράλληλα προωθούν και την διαφοροποίηση τους σε πιο ευνοϊκά, λιγότερο κυτταροτοξικά είδη NK. Με την σειρά τους, τα NK κύτταρα συνεισφέρουν στην ομοιόσταση των Treg με την μείωση των Th17[31].



Εικόνα 1. Ανοσιακή ισορροπία στην μητρική-εμβρυϊκή διεπαφή κατά την κύηση. Τα κύτταρα της εξωτερικής τροφοβλάστης (EVTs) δεν εκφράζουν πολυμορφικούς HLA-A, B αλλά μη πολυμορφικούς HLA-E, G και F δείκτες. Τα HLA-G και HLA-E προστατεύουν τα EVTs μέσω της μείωσης της κυτταροτοξικότητας των NK. Τα Treg μπορούν να αναγνωρίσουν πατρικά αντιγόνα μέσω των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και επάγουν την ανοχή.

2.2 Τα χαρακτηριστικά των B ρυθμιστικών κυττάρων

Τα B κύτταρα είναι κυρίως γνωστά για την επαγωγή των ανοσιακών αποκρίσεων μέσω της παραγωγής αντισωμάτων. Παρόλα αυτά υπάρχουν ενδείξεις ότι μερικοί υποπληθυσμοί B κυττάρων δεν ενεργούν με τον ίδιο τρόπο.

Το 1974 έγινε η πρώτη έρευνα η οποία αναφέρθηκε σε B κύτταρα τα οποία μπορούσαν να καταστείλουν αντιδράσεις υπερευαισθησίας, σε ινδικά χοιρίδια, υπονοώντας έτσι την κατασταλτική τους επίδραση στα T κύτταρα. Καθώς αυτό αποτελούσε στοιχείο για τον ρόλο των B κυττάρων ως καταστολείς της φλεγμονής, το 2000 οι Mizoguchi et al. επίσημα περιέγραψαν έναν υποπληθυσμό B κυττάρων ο

οποίος κατέστειλε παρά προωθούσε την φλεγμονώδη αντίδραση σε μοντέλα ποντικών με ασθένειες του εντέρου. Αυτά τα B κύτταρα ονομάστηκαν B ρυθμιστικά ή Breg, και από τότε οι δράσεις των B κυττάρων σε περιβάλλον έλλειψης των B ρυθμιστικών συνδέθηκαν με προ-φλεγμονώδεις ανεξέλεγκτες αντιδράσεις όπως σε αυτοάνοσα νοσήματα και περιπτώσεις απόρριψης μεταμοσχεύσεων[35].

Τα B ρυθμιστικά κύτταρα αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 10% των ολικών B κυττάρων στην κυκλοφορία και μόνο το 20% αυτών παράγουν ιντερλευκίνη 10 (IL-10) μετά από διέγερση. Γενικά δυο θεωρίες επικρατούν για την φύση των B ρυθμιστικών κυττάρων: η μια υποστηρίζει ότι τα B κύτταρα προέρχονται από μια συγκεκριμένη κυτταρική σειρά με έναν μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος ελέγχει την ανοσοκατασταλτική τους ικανότητα, ενώ η δεύτερη προτείνει ότι τα B κύτταρα μπορούν να λάβουν ρυθμιστικό φαινότυπο μετά από συγκεκριμένο ερέθισμα[35-36]. Όσον αφορά τον χαρακτηρισμό των πληθυσμών αυτών δεν έχει γίνει κάποια σημαντική εξέλιξη στην ανακάλυψη ενός καθολικού δείκτη για τον εντοπισμό τους, παρόλα αυτά οι πρώτες έρευνες έχουν αποδείξει ότι οι αντιφλεγμονώδης δράση τους οφείλεται στην παραγωγή της κυτοκίνης IL-10.

Στον άνθρωπο τα πιο συχνά υποείδη B κυττάρων με ανοσοκατασταλτικό ρόλο είναι τα ανώριμα B κύτταρα, IL-10 B κύτταρα (B10), GrB B κύτταρα, B₁ και πλασματοκύτταρα. Σε ποντικούς τα B ρυθμιστικά που παράγουν IL-10 γνωστά και ως B10 έχουν χαρακτηριστεί με τους δείκτες CD1b και CD5. Σε μια έρευνα που έγινε σε ανθρώπους απομονώθηκαν CD19CD24CD38 B κύτταρα, από περιφερικό αίμα, και ταξινομήθηκαν ως B ρυθμιστικά καθώς εμφάνιζαν την ικανότητα να καταστέλλουν την φλεγμονή μέσω της συντονισμένης διέγερσης της παραγωγής IL-10 και με το μονοπάτι των CD80 και CD86, ενώ ένας πληθυσμός CD24CD27 B κυττάρων εμφάνιζαν μεγάλη αναλογία με τα αντίστοιχα B10 των ποντικών. Αυτή η ετερογένεια μεταξύ των πληθυσμών μάλλον υποδεικνύει ότι τα Breg δεν προέρχονται από μια μοναδική κυτταρική σειρά, παρά λαμβάνουν τις ρυθμιστικές τους ικανότητες μέσω διεγέρσεων από το περιβάλλον τους.

Ο πιο μελετημένος υποπληθυσμός των Breg καθορίζεται από τους δείκτες CD24 και CD38. Φαινοτυπικά αυτά τα κύτταρα εκφράζουν επίσης IgM, IgD, CD5, CD10 και CD1d, ομοιάζοντας με κάποιο τρόπο τα μεταβατικά B κύτταρα. Τα B ρυθμιστικά

κύτταρα χαρακτηρίζονται κυρίως από την λειτουργία τους, καθώς η έρευνα των Mauri et al., έδειξε ότι τα CD19CD24CD38 Breg είναι κύτταρα που κατά κύριο λόγο παράγουν IL-10 και μπορούν να καταστείλουν την INF γ καθώς επίσης και να μπλοκάρουν την διαφοροποίηση των Th1 και Th17 και παράλληλα διατηρώντας τον πληθυσμό των Treg.

Στην προσπάθεια να βρεθεί ένας καθολικός δείκτης, όπως ο αντίστοιχος μεταγραφικός παράγοντας Foxp3 των T ρυθμιστικών κυττάρων. Ενδείξεις κατευθύνουν προς το μόριο ανοσοσφαιρίνης T κυττάρων και περιοχή βλεννίνης 1 (TIM-1) ως έναν πιθανό δείκτη καθώς μπορεί να χαρακτηρίσει το 70% των B ρυθμιστικών κυττάρων που παράγουν IL-10.

Εκτός από την αναστολή των φλεγμονώδων αντιδράσεων με την δράση της IL-10 έχουν μελετηθεί και άλλοι μηχανισμοί με τους οποίους μπορεί να γίνει ρύθμιση της ανοσοκαταστολής, οι οποίοι περιλαμβάνουν το μόριο TGF β (ειδικά για την διαφοροποίηση των ανεκτικών DCs) και την παραγωγή της ινδολεαμίνης 2,3-διοξυγενάση (IDO), την διακυτταρική επαφή CD80/CD86 με τα T κύτταρα, μέσω του μονοπατιού PD-L1 των T βοηθητικών κυττάρων, και παραγωγή αδενοσίνης εξαρτώμενη από CD37[35-36-37].

Ιοί, βακτήρια και παράσιτα μπορούν να διεγείρουν τα B κύτταρα ώστε να λάβουν ρυθμιστικές ιδιότητες. Σύντομα μετά την μόλυνση ποντικών, η Salmonella και Listeria ώθησαν την διαφοροποίηση B κυττάρων σε αντίστοιχα που εκκρίνουν IL-10[39]. Αυτά τα B κύτταρα μπορούν να καταστείλουν ανοσιακές αποκρίσεις ενάντια σε αλλεργιογόνα, με μια έρευνα σε ανθρώπους να παρουσιάζει αυτή την εναλλακτική ρυθμιστική ικανότητα τους μετά από μόλυνση με έλμινθες. Η έλλειψη από τέτοιου είδους λοιμώξεις στις δυτικές χώρες προτάθηκε ως ένας από τους λόγους για τους οποίους παρατηρούνται αυξημένα ποσοστά αλλεργιών και αυτοάνοσων νοσημάτων σε αυτές τις χώρες[40].

Ο ρόλος των B ρυθμιστικών έχει ερευνηθεί περισσότερο σε μολύνσεις από ιούς λόγω της απόκρισης των ασθενών, όπως την νόσο HIV και την χρόνια HBV λοίμωξη[41].

2.2.1 Μηχανισμοί των B ρυθμιστικών κυττάρων στην κύηση

Από την στιγμή που ανακαλύφθηκαν τα Breg έχουν συνδεθεί κυρίως με περιπτώσεις αυτοάνοσων νοσημάτων, μεταμοσχεύσεις και καρκίνο. Όπως έχει αναφερθεί η ρυθμιστική ικανότητα τους οφείλεται στην παραγωγή αντιφλεγμονώδους κυτοκίνης, της IL-10. Η δράση της είναι να περιορίσει την εκτεταμένη φλεγμονή και να διατηρήσει την ομοιόσταση μέσω μηχανισμών όπως η καταστολή της παρουσίας αντιγόνων και η έκφραση συνδιεγερτικών μορίων CD80, CD86 και MHC τάξης II από τα μακροφάγα και τα DCs, καθώς και τον περιορισμό της έκκρισης κυτοκινών από τα T κύτταρα σε ανοσιακές αποκρίσεις προωθώντας έτσι την διαφοροποίηση τους σε Treg[42-43].

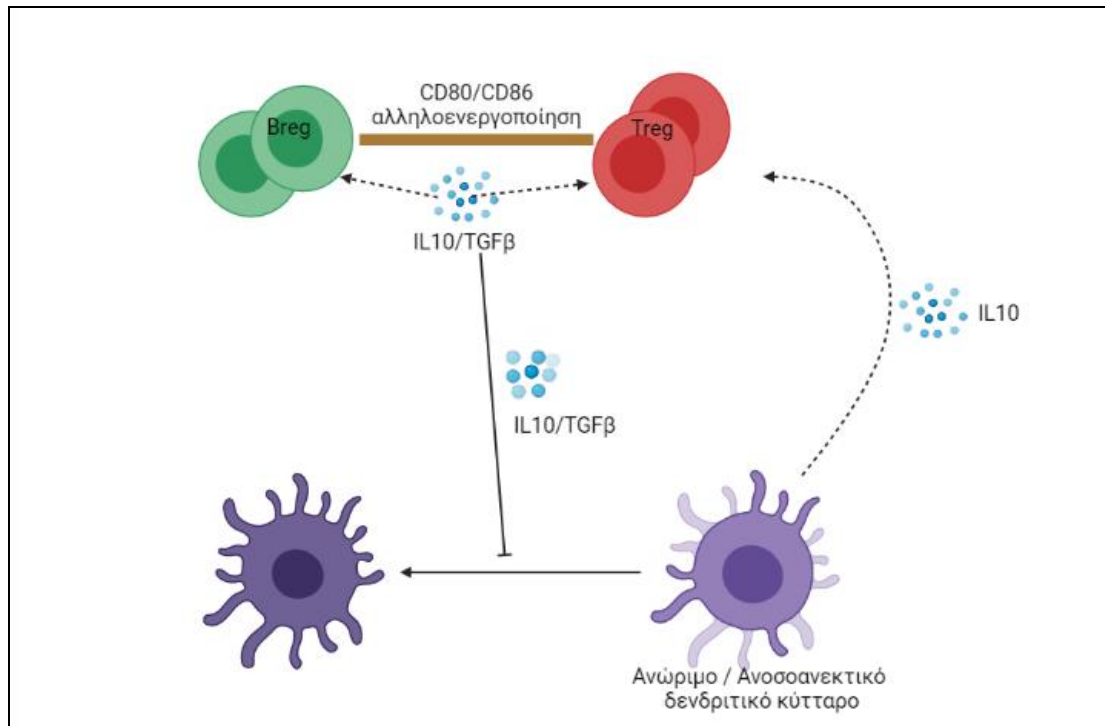
Άλλοι μηχανισμοί εκτός από την IL-10, περιλαμβάνουν τα μόρια TGFβ, IL-35 και IL-17. Η έκφραση TGFβ από τα B κύτταρα προάγει τον σχηματισμό Treg κυττάρων με θεραπευτικές ιδιότητες στον διαβήτη, ανοχή σε μεταμοσχεύσεις, αλλεργικές ασθένειες και στην ελκώδη κολίτιδα [44]. Επιπλέον σε πειραματικά μοντέλα από ποντικούς το 60% των B κυττάρων που εκφράζουν IL-10, εκφράζουν επίσης και IL-35, μια κυτοκίνη η οποία χαρακτηρίζεται ως κρίσιμη για την ανάρρωση σε περιπτώσεις αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (EAE), και αναγκαία για την καλύτερη αντίσταση σε μόλυνση από σαλμονέλα. Η έκκριση της IL-17 από τα ενεργοποιημένα B κύτταρα έχει αναφερθεί ότι προκαλείται μετά την επαφή τους με την προερχόμενη από παράσιτα trans-σιαλιδάση, κάτι που βοηθάει στην αντιμετώπιση της λοίμωξης. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν την σημασία των Breg για την αντιμετώπιση καταστάσεων που οδεύουν προς την δημιουργία χρόνια φλεγμονής.

Ορισμένοι επιφανειακοί δείκτες στα B κύτταρα έχουν χαρακτηριστεί ως κύριοι υποκινητές της αντιφλεγμονώδους δράσης των κυττάρων αυτών με πιο μελετημένους τους PD-L1, granzyme B και FasL. Η θετική ρύθμιση του PD-L1 στα B κύτταρα έχει δείξει ότι είναι σημαντική στην καταστολή της ενεργότητας των T κυττάρων. Στην νόσο EAE (αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα) μελέτες δείχνουν ότι τα PD-L1 B κύτταρα παρέχουν προστασία και μειώνουν την σοβαρότητα της νόσου μέσω καταστολής των T βοηθητικών κυττάρων και προώθησή της παραγωγής των Treg. Επιπλέον, τα PD-L1 B κύτταρα φαίνεται ότι ρυθμίζουν τα T κυτταροτοξικά κύτταρα στην σαλμονέλα καθώς και στον καρκίνο του προστάτη, με την υψηλή τους έκφραση να επηρεάζει άμεσα την απόκριση των Th κυττάρων και την διαφοροποίηση τους μέσω εξασθένησης οδών σηματοδότησης σχετιζόμενοι με το μόριο PD-L1[45].

Με παρόμοιο τρόπο τα Β κύτταρα που εκφράζουν FasL είναι σημαντικά για την αποτροπή απόρριψης μοσχευμάτων σε ποντικούς και την ρύθμιση της πορείας αυτοάνοσων νοσημάτων μέσω μηχανισμών όπως η προώθηση της απόπτωσης των αυτό-αντιδραστικών Τ κυττάρων και την προαγωγή Treg. Τα Β κύτταρα που παράγουν το γρανένζυμο Β φαίνεται ότι έχουν ρυθμιστικές ιδιότητες ως προς τα Τ δραστικά κύτταρα σε μικροπεριβάλλον όγκου[46].

Σε πειράματα ποντικών όπου έγινε μεταφορά Breg κυττάρων, σε ποντικούς με προδιάθεση αποβολής, προωθήθηκε η μητρική-εμβρυϊκή ανοχή με αύξηση των Treg και διατήρηση των DCs σε μια ανώριμη κατάσταση. Σε ανθρώπους παρατηρήθηκε ότι γυναίκες που τις χορηγήθηκε το φάρμακο rituximab, ένα αντίσωμα που μειώνει των πληθυσμό των Β κυττάρων, τα αποτελέσματα έδειξαν μεγαλύτερο ποσοστό αποβολών του πρώτου τριμήνου. Μία πρόσφατη ανασκόπηση πάνω σε αυτό το φάρμακο έδειξε ότι όταν χορηγήθηκε σε ασθενείς με αυτοάνοση απορρύθμιση μέσα σε ένα εξάμηνο από την σύλληψη είχαμε 12% αύξηση των αποβολών, με 40% τοκετό πριν τις 37 εβδομάδες και επίσης 39% των νεογνών εμφάνισαν μειωμένα ποσοστά Β κυττάρων[47-48].

Μέχρι και σήμερα δεν έχουμε ξεκάθαρη εικόνα για την πραγματική σημασία του συγκεκριμένου υποσυνόλου στην κύηση καθώς και μετέπειτα στα νεογνά. Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι τα μητρικά Β κύτταρα είναι απαραίτητα για την δημιουργία περιγεννητικής ανοχής μετά εφαρμογή αντιγόνου της βλεννογόνου σε μοντέλο ποντικού , για την προστασία των απογόνων από πειραματική αλλεργία του αεραγωγού. Στην πραγματικότητα, η απουσία των Β κυττάρων προκαλεί επιδείνωση των αλλεργικών αποκρίσεων στους απογόνους.



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των T ρυθμιστικών κυττάρων (Treg), B ρυθμιστικών κυττάρων (Breg) και δενδριτικών κυττάρων (DCs) κατά την κύηση. Τα Breg δημιουργούν ένα περιβάλλον ανοχής, είτε μέσω της άμεσης επαγωγής και ανάπτυξης των Treg μέσω του CD80/CD86 μονοπατιού σηματοδότησης, καθώς και μέσω της παραγωγής των IL10 και TGFβ, είτε μέσω της καταστολής της ωρίμανσης των DCs, κάνοντας τα να διατηρήσουν έναν φαινότυπο ανοσοανεκτικότητας. Τα Treg και DCs παράγουν IL10 και μπορούν να διατηρήσουν τον βρόχο ανατροφοδότησης.

Κεφάλαιο 3

3. Σκοπός μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας βιβλιογραφικής ανασκόπησης είναι η εύρεση πρόσφατων μελετών που αφορούν τους υποπληθυσμούς των Τ ρυθμιστικών κυττάρων και Β ρυθμιστικών κυττάρων, την μελέτη της ρύθμιση στην οποία υπόκεινται κατά την διάρκεια της κύηση καθώς και την κλινική εικόνα που παρουσιάζουν αυτές οι αλλαγές στο τελικό αποτέλεσμα της κύησης. Μέσα από την μελέτη αυτών των ερευνών θα γίνει αξιολόγηση της σημασίας ορισμένων υποσυνόλων αυτών των κυττάρων ως προς την προγνωστική-διαγνωστική αξία, που προσδίδει η προσμέτρηση τους, για την έκβαση της κύησης.

Κεφάλαιο 4

4. Μεθοδολογία

Για τους σκοπούς αυτής της εργασίας πραγματοποιήθηκε ανασκόπηση της σχετικής βιβλιογραφίας σε διεθνώς έγκυρες και επιστημονικά κατοχυρωμένες βάσεις δεδομένων (Pubmed, Google scholar, NCBI, Pubmed Central, Science Direct, Embase). Αναζητήθηκαν έρευνες που πραγματοποιήθηκαν και δημοσιεύτηκαν από το 2016 μέχρι σήμερα καθώς από εκείνη την χρονική περίοδο παρατηρήθηκαν οι πρώτες έρευνες που ταίριαζαν στα κριτήρια αναζήτησης.

Οι λέξεις κλειδιά που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση ήταν “T regulatory cells”, “B regulatory cells”, “pregnancy”, “pregnancy complications”, “flow cytometry”, “surface markers”. Οποιαδήποτε καταχώριση αφορούσε αδημοσίευτες και εμπειρικές έρευνες απορρίφθηκε.

Το σκεπτικό αναζήτησης ήταν να βρεθούν πειραματικές μελέτες που αφορούσαν πειράματα σε δείγματα από ανθρώπους, και πιο συγκεκριμένα εγκυμονούσες γυναίκες, και στα οποία εφαρμόστηκε ποσοτικοποίηση κυρίως επιφανειακών δεικτών (καθώς σε ορισμένες περιπτώσεις είχαμε συνδυασμό επιφανειακών με ενδοκυτταρικούς δείκτες) με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής.

Τα βασικά ερωτήματα που απευθύνθηκαν στην διαδικασία διαλογής της βιβλιογραφίας ήταν:

- Αν τα T και B ρυθμιστικά κύτταρα υπόκεινται σε οποιαδήποτε σημαντική στατιστικά ρύθμιση κατά την διάρκεια της κύησης.
- Αν αυτή η ρύθμιση μπορεί να ερμηνευτεί με τρόπο που να συσχετιστεί με την ομαλή έκβαση της κύησης ή με κάποια επιπλοκή της.

Κεφάλαιο 5

5. Αποτελέσματα

5 Αποτελέσματα ερευνών για την ρύθμιση των T ρυθμιστικών κυττάρων στην κύηση

Όπως ήδη ξέρουμε με την κληρονόμηση των μισών γονιδίων από τον πατέρα, το έμβρυο θεωρείται ημι-αλλογενές, κάτι το οποίο οδηγεί σε ένα παράδοξο καθώς το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας πρέπει να έχει την δυνατότητα να παρέχει ανοσιακή ανοχή προς τα αντιγόνα του πατέρα για την επιτυχημένη έκβαση της κύησης. Αρχικά γνωρίζουμε ότι υπάρχει μια αλλαγή από τα Th1 κύτταρα που προάγουν φλεγμονώδεις αντιδράσεις προς τα Th2 τα οποία είναι αντιφλεγμονώδη. Παρόλα αυτά κατά την φυσιολογική κύηση το ενδομήτριο περιέχει μειωμένη αναλογία CD4/CD8 κυττάρων συγκριτικά με την κυκλοφορία και παράλληλα, μειωμένους αριθμούς από CCR6+ Th1, Th2 και Th17 κύτταρα, ενώ τα CCR6- Th1 και τα CD4CD25hiFoxP3 T ρυθμιστικά είναι αυξημένα. Αυτό δείχνει ότι η κατάσταση των διάφορων πληθυσμών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος κατά την κύηση αφορά περισσότερο μια ισορροπία μεταξύ των Th1, Th2, Th17 και ρυθμιστικών κυττάρων συμπεριλαμβανομένου τόσο της έμφυτης όσο και της επίκτητης ανοσίας[49].

Επιπλέον είναι γνωστό ότι το ανοσοποιητικό σύστημα παίζει διαφορετικό ρόλο ανάλογα με την φάση της κύησης, καθώς μια φλεγμονώδη αντίδραση μπορεί να είναι σημαντική για την εμφύτευση της βλαστοκύστης, ενώ στην συνέχεια η μετάβαση σε μια αντιφλεγμονώδη κατάσταση για καθιέρωση ενός περιβάλλοντος ανοχής για την διατήρηση της εγκυμοσύνης και τελικά την αλλαγή ξανά προς την φλεγμονή κατά τον τοκετό.

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα Treg βρίσκονται στο ενδομήτριο καθ' όλη την διάρκεια του μηνιαίου κύκλου της γυναίκας και αυξάνονται στην ωοθυλακική φάση, υποδηλώνοντας ότι η μήτρα ετοιμάζεται για την εγκυμοσύνη κάτι που περιλαμβάνει

ανοσορυθμιστικές αλλαγές. Ορισμένες έρευνητικές μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι το ανοσοποιητικό της γυναίκας προετοιμάζεται για την εγκυμοσύνη μέσω της επαφής με αντιγόνα και ανοσορυθμιστικά μόρια που βρίσκονται στο σπερματικό πλάσμα. Σε ποντικούς τα CD4 και CD8 Treg αυξάνονται άμεσα μετά το ζευγάρισμα λόγω αυτής της επαφής με τα πατρικά αντιγόνα που βρίσκονται στο σπερματικό υγρό[50].

Σε εγκυμονούσες γυναίκες εντοπίζεται μεγαλύτερος αριθμός περιφερικών Treg από ότι σε μη εγκυμονούσες με τον αριθμό τους να αυξάνεται από το πρώτο τρίμηνο και να φτάνει στην μέγιστη τιμή του στο δεύτερο. Αυξημένα επίπεδα Treg μπορούν επίσης να εντοπιστούν και σε περιπτώσεις ασθενών με καρκίνο όπως έχει ήδη αναφερθεί λόγω της παρόμοιας εικόνας του μικροπεριβάλλοντος. Σε πειράματα σε ποντικούς όπου έγινε χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων για την μείωση της παραγωγής των Treg παρατηρήθηκε μειωμένο ποσοστό επιτυχίας της εμφύτευσης καθώς και εμβρυική επαναπορρόφηση, όταν αυτή η μείωση γινόταν στα αρχικά στάδια της εγκυμοσύνης. Λόγω παρόμοιου μοντέλου ανοσοποιητικού συστήματος, είναι πολύ πιθανό μεταβολές στον αριθμό και την λειτουργία των Treg να ευθύνονται για πολλές επιπλοκές των κύσεων[50].

Για τους παραπάνω λόγους είναι πολύ σημαντικό να κατανοήσουμε τον τρόπο με τον οποίο δέχονται ρύθμιση τα T ρυθμιστικά κύτταρα κατά την διάρκεια της κύησης και την λειτουργία των διαφόρων υπο-πληθυσμών τους καθώς η εικόνα αυτών των συγκεκριμένων κυττάρων θα μπορούσε να είναι σημαντική ένδειξη για την κλινική εικόνα και την έκβαση της εγκυμοσύνης.

Για να μπορέσουμε να εντοπίσουμε τους διάφορους πληθυσμούς T ρυθμιστικών κυττάρων καθώς και να τα απομονώσουμε είναι χρήσιμο να καθιερωθούν ορισμένοι καθολικοί δείκτες. Ένας από τους πρώτους δείκτες που χρησιμοποιήθηκε για να χαρακτηρίσει τα T ρυθμιστικά κύτταρα είναι ο **Foxp3**. Ο δείκτης αυτός αποτελεί τον κύριο μεταγραφικό ρυθμιστή για την προαγωγή, την ανάπτυξη, και την κατασταλτική ικανότητα των Treg, και αποτελεί μοναδικό δείκτη για αυτά τα κύτταρα. Απορρύθμιση του Foxp3 έχει συνδεθεί με αυτοάνοσα νοσήματα και μπορεί να προκαλέσει και αποτυχία καθιέρωσης ανοχής από το ανοσοποιητικό σύστημα. Ο αυξημένος αριθμός παραγωγής του Foxp3 έχει δείξει ότι προάγει την μετατροπή των

ανώριμων T κυττάρων σε Treg. Παρόλα αυτά αποτελεί έναν ενδοκυτταρικό δείκτη και δεν είναι εύκολο να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση Treg[51].

Ένας ακόμα δείκτης που χρησιμοποιήθηκε από τις πρώτες έρευνες για τον χαρακτηρισμό των T ρυθμιστικών κυττάρων είναι ο **CD25**. Ο δείκτης αυτός εκφράζεται σε κύτταρα που συμμετέχουν στην ρύθμιση των ανοσιακών αποκρίσεων και είναι σημαντικός για την περιφερική ανοχή, καθώς αποτελεί υποδοχέα της IL-2. Παρόλα αυτά τα T κύτταρα με φαινότυπο CD4CD25 μπορούν να είναι οποιοδήποτε είδος ενεργοποιημένου T κυττάρου, έτσι για να αυξηθεί η ειδικότητα τα T κύτταρα που παρουσιάζουν ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες εκφράζουν συνήθως μεγάλες ποσότητες CD25 (CD25^{hi})[52]. Μια πρόσφατη έρευνα χρησιμοποίησε τους συγκεκριμένους δείκτες (CD25Foxp3) έτσι ώστε να εξετάσει τις συχνότητες των πληθυσμών αυτών των κυττάρων, τόσο των CD4 όσο και των CD8, σε δείγματα περιφερικού αίματος γυναικών με προεκλαμψία.

Η προεκλαμψία αποτελεί μια από τις σημαντικότερες επιπλοκές της εγκυμοσύνης και συμβαίνει συνήθως στο 3^ο τρίμηνο εμφανίζοντας χαρακτηριστικά όπως αυξημένη πίεση και πρωτεϊνουρία. Οι λόγοι για την εμφάνιση αυτής της επιπλοκής μπορεί να είναι αγγειογόνοι παράγοντες, ενδοθηλιακή και αγγειακή δυσλειτουργία και ανωμαλίες του ανοσοποιητικού.

Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι όσον αφορά τα CD4 κύτταρα υπήρξε σημαντική μείωση του πληθυσμού σε δείγματα γυναικών με προεκλαμψία σε σύγκριση με μη εγκύους. Επίσης μεταξύ υγιών εγκύων γυναικών και υγιών μη εγκύων παρουσιάστηκε αύξηση στις πρώτες. Αυτή η αλλαγή μπορεί να είναι προϊόν ρύθμισης από ορμόνες όπως τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα. Η ίδια εικόνα υπήρξε και στον πληθυσμό των CD8 με τα συγκεκριμένα να εμφανίζουν την μικρότερη συχνότητα μεταξύ όλων των ομάδων. Η κοινή μείωση τόσο στα CD4 όσο και στα CD8 μπορεί να υποδηλώνει ότι τα κύτταρα αυτά συνεργάζονται για την επίτευξη της ανοχής. Τέλος, παρατηρήθηκε και μια αρνητική συσχέτιση αυτών των T κυττάρων με την συστολική και διαστολική πίεση, η οποία μπορεί να έχει σχέση με την υπέρταση που εμφανίζεται κατά την προεκλαμψία. Γνωρίζοντας την σημασία των Foxp3 κυττάρων στην παθογένεια ασθενειών όπως η στεφανιαία νόσος και η πνευμονική υπέρταση πιθανότατα υπάρχει συσχέτιση[53].

Η χρήση των δεικτών CD25, Foxp3 για τον εντοπισμό των T ρυθμιστικών κυττάρων, όπως αναφέρθηκε παρουσίαζε πρόβλημα λόγω της μειωμένης ειδικότητας καθώς και

της δυσκολίας απομόνωσης. Έτσι πρόσφατες μελέτες αναφέρονται στην ύπαρξη ενός επιφανειακού υποδοχέα της IL-7 (CD127) ο οποίος συσχετίζεται αντίστροφα με την έκφραση του Foxp3, και καθώς τα CD4CD127low/- κύτταρα αλληλεπικαλύπτονται σε μεγάλο ποσοστό με τα Foxp3, ο δείκτης CD127 μπορεί να ξεχωρίσει Treg από τα ενεργοποιημένα T κύτταρα. Τα ενεργοποιημένα δραστικά κύτταρα τα οποία εκφράζουν μεγάλο ποσοστό CD127 και δεν μπορούν να προάγουν ανοσοκατασταλτικές αντιδράσεις ανήκουν επίσης στον πληθυσμό των CD4CD25hi κυττάρων. Με βάση αυτά τα δεδομένα μια πρόσφατη έρευνα με σκοπό την συσχέτιση του αριθμού των Treg στην κυκλοφορία γυναικών με ανεξήγητες επαναλαμβανόμενες αυθόρμητες αποβολές (URSA), με υγιείς μη εγκυμονούσες, στηρίχτηκε στην υψηλή έκφραση CD25 και χαμηλή ή και καθόλου έκφραση του CD127 και χρησιμοποιήθηκε ως φαινότυπο για την απομόνωση των Treg τον CD4CD25CD127low/-.

Οι πολλαπλές αυτόματες αποβολές χαρακτηρίζονται από δύο ή και περισσότερες συνεχόμενες απώλειες της εγκυμοσύνης και επηρεάζουν περίπου το 1-2% των υποψήφιων μητέρων. Η αιτία αυτής της αντίδρασης πιστεύεται ότι είναι πολυπαραγοντική καθώς μπορεί να οφείλεται σε εμβρυϊκούς χρωμοσωμικούς παράγοντες, ανατομικές ανωμαλίες και ορμονικά προβλήματα με τις πιο πρόσφατες έρευνες να δείχνουν ότι πιθανότατα να ευθύνεται και η αποτυχία ανοχής μεταξύ μητέρας και εμβρύου.

Τα αποτελέσματα από αυτή την έρευνα έδειξαν ότι ο αριθμός των CD4CD25hiCD127low/- ήταν μικρότερος από τον αντίστοιχο πληθυσμό Treg στα υγιή δείγματα, ενώ παράλληλα και μια εξέταση της λειτουργίας τους έδειξε μειωμένη παραγωγή Foxp3 τόσο σε πρωτεϊνικά όσο και mRNA επίπεδα που συσχετιζόταν με τον αριθμό τους. Αυτή η εικόνα συμφωνούσε και με παλαιότερες έρευνες οι οποίες είχαν επίσης αναφέρει μειωμένο αριθμό Treg σε ασθενείς με URSA στην κυκλοφορία καθώς και σε δείγματα από το ενδομήτριο[54]. Σε παρόμοια μελέτη έγινε ποσοτικοποίηση του πληθυσμού των Treg σε δείγματα περιφερικού αίματος αλλά και δειγμάτων ενδομητρίου με σκοπό την σύγκριση τους, μεταξύ φυσιολογικών κύσεων και επιπλοκών. Για την απομόνωση των Treg πραγματοποιήθηκε η χρήση του φαινοτύπου CD4CD25CD127low/-CD45RA- (όπου ο δείκτης CD45RA- έχει συσχετιστεί με αυξημένη ανασταλτική ικανότητα των Treg σε πειράματα μεταμοσχεύσεων). Η μελέτη αυτή έδειξε ότι τα T ρυθμιστικά κύτταρα που προέρχονται από το ενδομήτριο αυξάνονται σημαντικά κατά το 3^ο τρίμηνο της

φυσιολογικής εγκυμοσύνης, τοπικά αλλά όχι στην κυκλοφορία. Όσον αφορά τις αποβολές του πρώτου τριμήνου όπως ήταν αναμενόμενο ο πληθυσμός των Treg ήταν μειωμένος σε σχέση με τις φυσιολογικές κυήσεις, ενώ παρόμοια κατάσταση φαίνεται να υπάρχει και στις περιπτώσεις που έχουμε προεκλαμψία του 3^{ου} τριμήνου, χωρίς να είμαστε σίγουροι αν αυτή η μείωση είναι η αιτία ή το αποτέλεσμα της νόσου[55].

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με μια ακόμα πρόσφατη μελέτη στην οποία έγινε επίσης σύγκριση των αριθμών των Treg σε δείγματα περιφερικού αίματος από υγιείς μη εγκυμονούσες, υγιείς εγκυμονούσες και γυναίκες με προεκλαμψία. Για την απομόνωση των κυττάρων εκτός από τον φαινότυπο CD4CD25CD127low/-, ο πληθυσμός των οποίων εμφάνισε και σε αυτή την μελέτη σημαντική μείωση στις γυναίκες με προεκλαμψία συγκριτικά με τις άλλες δυο ομάδες, χρησιμοποιήθηκε και ο δείκτης **HLA-G**.

Τα T ρυθμιστικά κύτταρα που εκφράζουν HLA-G, αποτελούν κύτταρα που προέρχονται από τον θύμο, πολλαπλασιάζονται με πολύ αργό ρυθμό και δεν εκφράζουν μόρια Foxp3. Τα κύτταρα αυτά παλαιότερα είχαν μελετηθεί σε πειράματα μεταμοσχεύσεων, σκλήρυνσης κατά πλάκας και μόλυνσης HIV-1. Στην παρούσα μελέτη η συχνότητα των CD4HLA-G κυττάρων ήταν σημαντικά αυξημένη στις υγιείς εγκυμονούσες από ότι στις μη εγκυμονούσες γυναίκες. Όσον αφορά τα δείγματα από τις γυναίκες με προεκλαμψία, τα T ρυθμιστικά ήταν και εκεί πολύ λιγότερα σε σχέση με τις υγιείς εγκυμονούσες. Τέλος εξετάστηκε και ο πληθυσμός των CD8HLA-G, για τα οποία δεν υπάρχει καμία σχετική μελέτη πέρα από μια που αφορούσε την μόλυνση HIV-1. Τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης ότι οι υγιείς εγκυμονούσες είχαν υψηλότερα ποσοστά αυτών των κυττάρων σε σχέση τόσο με τις μη εγκυμονούσες και αυτές με προεκλαμψία. Τα δεδομένα αυτά μπορεί να εισάγουν και τα HLA-G ρυθμιστικά κύτταρα ως σημαντικό καινούριο υποπληθυσμό ρυθμιστικών κυττάρων που διαδραματίζουν ενεργό ρόλο στην εγκυμοσύνη.

Σημαντική σημείωση είναι επίσης και το γεγονός ότι στις παραπάνω μελέτες εντοπίστηκε αρνητική συσχέτιση των πληθυσμών των CD4/8CD25CD127low/- με την συστολική και την διαστολική πίεση, κάτι το οποίο συμφωνεί και με προηγούμενες μελέτες που υποστήριζαν ότι τα Foxp3 ρυθμιστικά κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια κι άλλων επιπλοκών σχετιζόμενες με την υπέρταση[56].

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή μπορεί τα T ρυθμιστικά κύτταρα να έχουν μεγάλη σημασία στην δημιουργία ανοχής μεταξύ του εμβρύου και της μητέρας μέσω της καταστολής του ανοσοποιητικού συστήματος, παρόλα αυτά η κατάσταση που επικρατεί στο μικροπεριβάλλον της διεπαφής αποτελεί μια κατάσταση ισορροπία μεταξύ όλων των κυττάρων του τόσο της έμφυτης όσο και της επίκτητης ανοσίας. Για αυτό το λόγο έχει μεγαλύτερη σημασία η εξέταση του αριθμού των Treg κυττάρων σε σχέση με τα Th17 κύτταρα, των οποίων την φλεγμονώδη δράση καταστέλλουν. Σε πρόσφατη έρευνα που πραγματοποιήθηκε μεταξύ υγιών εγκύων και εγκύων με προεκλαμψία διερευνήθηκε αν υπάρχει κάποια αλλαγή τόσο στους πληθυσμούς των Treg όσο και των Th17 και αν η αναλογία τους μπορεί να έχει κάποια συσχέτιση με την κλινική εκδήλωση αυτής της νόσου. Για τον εντοπισμό των καθαρών T ρυθμιστικών κυττάρων έγινε χρήση του φαινοτύπου CD4CD25CD127low/- και για άλλη μια φορά αποδείχθηκε ότι ο αριθμός τους τείνει να μειώνεται σε γυναίκες με προεκλαμψία έναντι στις φυσιολογικές κήσεις. Επίσης μέσα από την μέτρηση και των δυο πληθυσμών κυττάρων και την μετέπειτα σύγκριση τους είδαμε ότι όπως και σε προηγούμενες μελέτες η αναλογία Treg/Th17 είναι αυξημένη σε υγιή άτομα ενώ το αντίθετο συμβαίνει στις περιπτώσεις με προεκλαμψία. Αυτή η αλλαγή της αναλογίας μεταξύ των δυο ομάδων δημιουργεί την ανάγκη να κατανοήσουμε ποιες είναι αυτές αιτίες που οδηγούν στην διαφοροποίηση των ανώριμων CD4 T κυττάρων προς την παραγωγή IL-17 και απομάκρυνση από τα Foxp3 Treg[57].

Άλλοι δείκτες οι οποίοι επιλέχθηκαν ως πιθανοί υποψήφιοι για τον χαρακτηρισμό των T κυττάρων στην εγκυμοσύνη ήταν οι **Tim-3** και **PD-1**. Από παλαιότερες έρευνες γνωρίζαμε ότι αυτά τα μόρια παίζουν σημαντικό ρόλο στην αρνητική ρύθμιση του ανοσοποιητικού που αφορούσαν ανοχή έναντι ιών και μεταστάσεις όγκων. Πιο συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι ο PD-1 αποτελεί δείκτη για δυσλειτουργικά T κύτταρα και το μπλοκάρισμα του σηματοδοτικού του μονοπατιού οδηγεί σε αντιστροφή αυτής της κατάστασης. Επίσης ο Tim-3 έχει συσχετιστεί με παρόμοιο τρόπο και το μπλοκάρισμα του επαναφέρει τον πολλαπλασιασμό και την παραγωγή κυτταροκινών σε T κύτταρα. Η συνέκφραση αυτών των δεικτών χαρακτηρίζει τα περισσότερα εξουθενωμένα κύτταρα. Γνωρίζοντας αυτά, σε πρόσφατη έρευνα αξιολογήθηκε η έκφραση αυτών των δεικτών σε CD8 T κύτταρα από δείγματα ενδομήτριου και περιφερικού αίματος σε γυναίκες με υγιή εγκυμοσύνη καθώς και γυναίκες που είχαν αποβολή, με σκοπό να δούμε αν η έκφραση του έχει επίδραση

στην διατήρηση της ανοχής μεταξύ εμβρύου και μητέρας. Αρχικά αποδείχτηκε ότι υπάρχει αύξηση της συνέκφρασης αυτών των δυο δεικτών από τα πρώτα κιόλας στάδια της κύησης, σε φυσιολογικά περιστατικά, ενώ παράλληλα αυτός ο πληθυσμός κυτταροτοξικών CD8 T κυττάρων έδειξε ιδιότητες παραγωγής κυτοκινών παρόμοιες με τα αυτές των Th2, υποδηλώνοντας την σημασία αυτών των κυττάρων για την καταστολή των φλεγμονωδών αντιδράσεων. Όπως ήταν αναμενόμενο στα δείγματα που προέρχονταν από γυναίκες που είχαν προηγούμενη αποβολή ο αριθμός αυτών των ρυθμιστικών κυττάρων στο ενδομήτριο ήταν μικρότερος σε σχέση με τις υγιείς[58].

Με βάση προηγούμενες μελέτες πάνω στην αποφυγή του καρκίνου από την ρύθμιση του ανοσοποιητικού καθώς και την ανοχή απέναντι σε μόσχευμα, το μονοπάτι **PD-1/PD-L1** φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο σε όλες αυτές τις διαδικασίες όπου είναι απαραίτητη η ανοσιακή καταστολή.

Αρχικά, η διαμεμβρανική πρωτεΐνη PD-1 αποτελεί ένα συν-κατασταλτικό μόριο και εκφράζεται από ένα μεγάλο πληθυσμό κυττάρων του ανοσοποιητικού συμπεριλαμβανομένων των T κυττάρων, T ρυθμιστικών, B κυττάρων, μονοκύτταρων και δενδριτικών κυττάρων. Από την άλλη, υπάρχουν οι συνδέτες του PD-1, οι PD-L1 και PD-L2, οι οποίοι σύμφωνα με μελέτες εμφανίζουν διαφορετικό τρόπο έκφρασης ανάλογα με τον ιστό που βρίσκονται. Μετά την σύνδεση του συνδέτη με το μόριο PD-1 γίνεται καταστολή των αυτό-δραστικών T, B κυττάρων για να προάγουν την ανοχή. Αν και ο PD-1 ρυθμίζει την ομοιόσταση των T κυττάρων, και προστατεύει από την δημιουργία αυτοανοσίας, η υπερέκφραση του μπορεί να προκαλέσει δυσλειτουργία του κυττάρου και καταστολή της έκφρασης IFN γ . Συνεπώς αυτό το μονοπάτι έχει σημαντικό ρόλο στην ισορροπία μεταξύ ανοσίας και ανοχής. Στην κύηση έχει αποδειχτεί ότι τα κύτταρα της συνκυτιοτροφοβλάστης και κυτιοτροφοβλάστης εκφράζουν PD-L1 στην επιφάνειά τους, οπότε η αλληλεπίδραση τους με το μόριο PD-1 που βρίσκεται σε T λεμφοκύτταρα μπορεί να προάγει την εξασθένισή τους. Μια πρόσφατη έρευνα ήταν σύμφωνη με αυτή την παρατήρηση και επίσης τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει και σημαντική αύξηση του μορίου PD-L1 στην επιφάνεια των Treg κυττάρων τόσο στην αρχή της κύησης όσο και στα επόμενα στάδια, σε φυσιολογικές κύσεις, δίνοντας έτσι έναν πιθανό μηχανισμό στον οποίο τα PD-L1 Treg καταστέλλουν την κυτταροτοξικότητα των PD1CD8 T

κυττάρων στο ενδομήτριο. Όσον αφορά την συσχέτιση του μονοπατιού PD-1/PD-L1 με την παθογένεια διάφορων συχνών επιπλοκών της κύησης δύο πρόσφατες έρευνες επιχείρησαν να συσχετίσουν της έκφραση των μορίων αυτών σε πληθυσμούς Treg κυττάρων με σκοπό να εξετάσουν τον τρόπο με τον οποίο αυτά αλληλεπιδρούν. Στην πρώτη έρευνα, συλλέχθηκε περιφερικό αίμα από γυναίκες, υγιείς εγκυμονούσες, και από γυναίκες με σύνδρομο υπέρτασης εγκυμοσύνης. Το σύνδρομο υπέρτασης της εγκυμοσύνης αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες μητρικού αλλά και εμβρυϊκού θανάτου, και χαρακτηρίζεται από συστολική πίεση $>140\text{mmHg}$ και διαστολική $>90\text{mmHg}$ και συμπεριλαμβάνει, ανάλογα με την σοβαρότητα των συμπτωμάτων από την υπερτασική διαταραχή περιπλοκής της εγκυμοσύνης, μέχρι και οξεία προεκλαμψία. Μητέρες που έχουν εμφανίσει το συγκεκριμένο σύνδρομο, και κυρίως την ακραία εκδήλωση του, την προεκλαμψία, έχουν μεγαλύτερο ρίσκο αποβολών, καρδιαγγειακών επεισοδίων, και ανεπάρκεια οργάνων. Τα έμβρυα αυτών των μητέρων βρίσκονται σε μεγαλύτερο ρίσκο για καθυστέρηση της ενδομητρικής ανάπτυξης τους, πρόωρο τοκετό και ενδομήτριο θάνατο. Λόγω της υποψίας ότι η παραπάνω νόσος οφείλεται σε ανοσιακούς παράγοντες έγινε έλεγχος του τρόπου ρύθμισης των Treg μέσω του μονοπατιού PD-1/PD-L1. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του δείκτη PD-1 στα Treg κύτταρα των ασθενών με την νόσο, και τα επίπεδα τους εμφάνιζαν θετική συσχέτιση με την σοβαρότητα της νόσου. Η εικόνα αυτή συμφωνούσε με το γεγονός ότι σε άτομα με υπερτασικό σύνδρομο είχαμε μείωση των ολικών Treg σε σχέση με υγιείς. Για τον δείκτη PD-L1 δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων, ενώ σε πείραμα χορήγησης PD-L1 Fc στα κύτταρα αυτά, ο οποίος αποτελεί ενεργοποιητής του μονοπατιού PD-1/PD-L1, οδήγησε σε αύξηση της παραγωγής των Treg όπως είχε παρατηρηθεί και σε πειράματα ποντικών στα οποία η χορήγηση του οδήγησε σε καταστολή της εξέλιξης αυτοάνοσων νοσημάτων. Άλλη μια σχετική έρευνα πάνω σε αυτό το σηματοδοτικό μονοπάτι εξέτασε τον τρόπο με τον οποίο επιδράει στην διαφοροποίηση των Treg μεταξύ ατόμων με επαναλαμβανόμενες αυθόρμητες αποβολές και υγιείς γόνιμες γυναίκες. Η έρευνα αυτή ακόμα και αν επιβεβαίωσε την αύξηση των Th17 κυττάρων σε γυναίκες με πολλαπλές αποβολές δεν εντόπισε κάποια σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παραγωγής των PD-1 και PD-L1 στην επιφάνεια των Treg και την παθογένεια της νόσου, άλλα από την άλλη υπήρξε μειωμένη παραγωγή τους στα Th17 κύτταρα, κάτι το οποίο μπορεί να ωθεί την ισορροπία

μεταξύ Th17 και Treg προς την διαφοροποίηση των T κυττάρων στην πλευρά των φλεγμονωδών κυττάρων[58-59-60].

Συγγραφέας	Παρουσία T reg	Πληθυσμός T reg	Επίδραση στο κλινικό αποτέλεσμα	Σχόλιο
Zare, et al. (53)	Μειωμένη	CD4+CD25+Foxp3+, CD8+CD25+Foxp3+	Προεκλαμψία	Παρατηρήθηκε επίσης αρνητική συσχέτιση των πληθυσμών αυτών με την συστολική και διαστολική πίεση.
Luo et al. (54)	Μειωμένη	CD4+CD25highCD127low/-	Πολλαπλές αυθόρμητες αποβολές	Παρατηρήθηκε μαζί με τον αριθμό και παράλληλη μείωση της κατασταλτικής ικανότητας των Treg.
Tsuda et al. (55)	Μειωμένη	CD4+CD25+CD127low/-CD45RA-	Προεκλαμψία	Δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή του αριθμού των T reg μεταξύ φυσιολογικών κυήσεων (1 ^ο εξάμηνο) και αποβολών. Μειωμένος αριθμός T reg παρατηρήθηκε σε περιπτώσεις προεκλαμψίας σε σχέση με υγείς εγκύους (3 ^ο εξάμηνο).
M. Zare, et al. (56)	Μειωμένη	CD4+CD25+CD127low/-, CD4+HLA-G+, CD8+HLA-G+	Προεκλαμψία	Παρατηρήθηκε μείωση των συγκεκριμένων πληθυσμών T reg σε γυναίκες με προεκλαμψία ενώ παράλληλα υπήρξε και ελάττωση της ανοσοκατασταλτικής ικανότητας των κυττάρων αυτών.
Santner-Nanan et al. (57)	Μη σημαντική διαφορά	CD4+CD127lowCD25+, CD4+CD25high	Προεκλαμψία	Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ υγιών και εγκύων με προεκλαμψία καθώς και παρόμοια ανοσοκατασταλτική ικανότητα.
S-C Wang et al. (58)	Μειωμένη	Tim-3+PD-1+CD8+	Αυτόματη αποβολή	Παρατηρήθηκε αύξηση των συγκεκριμένων κυττάρων σε υγείς εγκυμοσύνες, μεγαλύτερο ποσοστό στην περιοχή της μήτρας, ενώ σε αυτόματες αποβολές υπήρχε μείωση αντίστοιχα.
L. Jiang et al. (59)	Μειωμένη	CD4+CD25+, (PD-1 mRNA)	Υπέρταση σχετιζόμενη με εγκυμοσύνη, Προεκλαμψία	Παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς εμφάνιζαν αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης PD-1 σε σχέση με τις υγιείς εγκύους.
Wang et al. (60)	Μειωμένη	CD45+CD3+CD4+CD25+CD127dim/-	Πολλαπλές ανεξήγητες αποβολές	Η έκφραση των PD-1 και PD-L1 στα Th1 και Th17 κύτταρα μπορεί να αποτελεί πιθανό μηχανισμό που προκαλεί ανισορροπία μεταξύ Th1, Th17 και Treg.

Πίνακας 1. Σύνοψη αποτελεσμάτων ερευνών σχετικές με την παρουσία Treg στην κύηση.

5.1 Αποτελέσματα ερευνών για την ρύθμιση των B ρυθμιστικών κυττάρων στην κύηση

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή τα B ρυθμιστικά κύτταρα πιστεύεται ότι προάγουν ένα σταθερό προφίλ ανοσιακής ανοχής στο τοπικό μικροπεριβάλλον. Προηγούμενες έρευνες πάνω σε αυτά τα κύτταρα αφορούσαν κυρίως αυτοάνοσα νοσήματα, ανοχή στην ανάπτυξη του καρκίνου και προώθηση ανοχής σε μεταμοσχεύσεις. Από έρευνες σε μοντέλα ποντικών γνωρίζουμε ότι οι ορμόνες της εγκυμοσύνης μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση κυττάρων του ανοσοποιητικού όπως είναι και τα Breg. Έχει αποδειχθεί ότι η αύξηση της γοναδοτροπικής ορμόνης οδήγησε στην προαγωγή της ανάπτυξης ενός πληθυσμού Breg κυττάρων με φαινότυπο **CD1dhiCD5**, που παράγουν IL-10 με αποτέλεσμα να προστατεύσουν τους ποντικούς από την αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα. Επίσης, η προγεστερόνη προάγει αντιδράσεις του ανοσοποιητικού με Th2 χαρακτηριστικά, μειώνοντας έτσι τις φλεγμονώδεις κυτοκίνες και αυξάνοντας την παραγωγή IL-10. Η πρώτη συσχέτιση της κύησης με τα B ρυθμιστικά έγινε επίσης σε ποντικούς στους οποίους δείχθηκε ότι η αύξηση του πληθυσμού των CD1dCD5 Breg ήταν απαραίτητη για την αποφυγή αποβολής.

Αυτές οι ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες των Breg αποδίδονται σε διαφορετικά είδη και για αυτό είναι πολύ σημαντικό να γίνει πρόοδος προς τον χαρακτηρισμό και την μελέτη της λειτουργίας καθενός από αυτά. Η δυσκολία του να ταυτοποιήσουμε συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες των B ρυθμιστικών κυττάρων μαζί με την φαινοτυπική ετερογένεια που παρουσιάζουν αποτελεί ένδειξη ότι δεν προέρχονται από μια κοινή κυτταρική σειρά παρά αναπτύσσονται ως απάντηση σε φλεγμονώδη μηνύματα για την παροχή ανοσοκαταστολής. Επίσης είναι ακόμα αμφιλεγόμενο το αν η λειτουργία των B κυττάρων αυτών είναι ειδική για αυτόν τον τύπο κυττάρων ή αποτελεί στάδιο της ωρίμανσης τους.

Για τον χαρακτηρισμό τους ο πιο σημαντικός δείκτης μέχρι και αυτή την στιγμή αποτελεί η **IL-10**, αλλά οι πιο συχνόι φαινότυποι που τα χαρακτηρίζουν αποτελούν οι **CD24hiCD27** και **CD24hiCD38hi**. Από τις πρώτες έρευνες που έγιναν με την χρήση αυτών των δεικτών επιχείρησαν να εξετάσουν τον ρόλο των B ρυθμιστικών κυττάρων στην πορεία της φυσιολογικής κύησης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει αύξηση του πληθυσμού με την έναρξη της κύησης, όπως είχε παρατηρηθεί και σε μοντέλα

ποντικών, ενώ κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται σε αποβολές πρώτου τριμήνου όπου τα επίπεδα των Breg ήταν περίπου αντίστοιχα με αυτά υγιών μη εγκύων γυναικών[66]. Σε μια άλλη μελέτη έγινε έλεγχος της δράσης των B ρυθμιστικών στα στάδια μεταξύ 3^{ου} τριμήνου και μετά τον τοκετό[65]. Σε γυναίκες οι οποίες διένυαν το 3^ο τρίμηνο της εγκυμοσύνης και ακόμα και τον τοκετό παρατηρήθηκε σημαντικά χαμηλότερος αριθμός Breg (CD24hiCD38hi) σε σχέση ακόμα και με μη εγκυμονούσες γυναίκες. Παρόλα αυτά, ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι ακόμα και αν η πλειονότητα των B κυττάρων μετά τον τοκετό επανήλθε σε φυσιολογικές τιμές, ο πληθυσμός των CD24hiCD38hi Breg ήταν σημαντικά αυξημένος σε σχέση με τον αντίστοιχο των υγιών ατόμων. Επειδή η λεμφοποίηση των B κυττάρων είναι μια διαδικασία που υπόκειται σε ενδοκρινικό έλεγχο κατά την εγκυμοσύνη τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να εξηγούνται από την μείωση των ορμονικών επιπέδων που συμβαίνει μετά τον τοκετό και μπορεί να οδηγούν σε ενεργοποίηση των B κυττάρων.

Στην συνέχεια έρευνες που έγιναν με σκοπό να συσχετίσουν τον ρόλο των B ρυθμιστικών σε συχνές περιπλοκές της κύησης εμφάνισαν τα εξής αποτελέσματα: η πρώτη έρευνα αφορούσε γυναίκες με παρελθόν πολλαπλών αποτυχιών εμφύτευσης από τις οποίες έγιναν μετρήσεις σε δείγματα περιφερικού αίματος. οι ασθενείς με προηγούμενες αποτυχημένες εμβρυομεταφορές είχαν μειωμένο αριθμό Breg (**CD19 IL-10**) κυττάρων σε σχέση με τα υγιή άτομα και παρατηρήθηκε και μειωμένη λειτουργικότητα τους, ενώ παράλληλα η συχνότητα του πληθυσμού των κυττάρων εμφάνισε αρνητική συσχέτιση με τον αριθμό των αποτυχημένων εμβρυομεταφορών[64].

Παρόμοια αποτελέσματα υπήρξαν και σε μια ακόμα μελέτη η οποία όμως αφορούσε γυναίκες με πρόωρη γέννα. Ως πρόωρη γέννα αναφέρουμε τον τοκετό που συμβαίνει πριν την ολοκλήρωση 37 εβδομάδων κύησης. Ο αυθόρμητος πρόωρος τοκετός μπορεί να είναι αποτέλεσμα πρόωρης κολπικής διαστολής ή ακόμα και πρόωρης θραύσης των μεμβρανών. Οι παράγοντες που εντείνουν τον κίνδυνο μπορεί να είναι από μητρο-πλακουντική ισχαιμία και αιμορραγία, σε μικρό μήκος κόλπου έως και πολυυδράμνιο. Η σύγκριση των γυναικών αυτών έγινε με γυναίκες λίγο πριν τον τοκετό με καισαρική τομή και τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένο αριθμό B κυττάρων που συνοδεύονταν με μειωμένο υποπληθυσμό Breg, στις γυναίκες που γέννησαν πρόωρα. Κάτι τέτοιο μπορεί να αιτιολογεί την εικόνα που παρουσιάζουν καθώς η έλλειψη Breg σε στάδια πολύ πιο πριν από τον τοκετό μπορεί να πυροδοτεί

τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις του τοκετού πολύ νωρίτερα σε σχέση με τις υγιείς[62]. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε γυναίκες με ιστορικό προηγούμενων επαναλαμβανόμενων αποβολών ο αριθμός των CD5CD1d Breg ήταν αρκετά μειωμένος σε σχέση με υγιείς εγκυμονούσες, ενώ υπήρχε και αρνητική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των κυττάρων και τον αριθμό των προηγούμενων αποβολών. Επιπλέον παρατηρήθηκε και μείωση του μόριο PD-L1 που εκφράζεται στα B ρυθμιστικά κύτταρα, κάτι το οποίο μπορεί να είναι ένδειξη μειωμένης ανοσοκατασταλτικής ικανότητας των κυττάρων[63].

Προηγούμενη έρευνα πάνω στα B ρυθμιστικά κύτταρα έδειξε ότι με την μεταφορά βλαστικών κυττάρων από τον την κυκλοφορία του ομφάλιο λώρου, έναντι από τον μυελό των οστών, υπήρξε μεγαλύτερη επιτυχία μεταμόσχευσης σε ασθενείς που εμφάνιζαν σχετικά μειωμένο ποσοστό αντιστοιχίας μεταξύ δέκτη-δότη. Ο πιθανότερος μηχανισμός που εξηγεί αυτή την συμπεριφορά αποτελεί την ρύθμιση μέσω Breg κυττάρων, τα οποία πιστεύεται ότι έχουν μεγαλύτερη δραστηριότητα στο σημείο του ομφάλιου λώρου από ότι στην κυκλοφορία. Στην σχετική έρευνα, για την κατανόηση των μηχανισμών των B ρυθμιστικών λήφθηκε δείγμα αίματος από ομφάλιο λώρο υγιών γυναικών και συγκρίθηκε με περιφερικό αίμα υγιών ατόμων. Όπως ήταν αναμενόμενο ο πληθυσμός των Breg (**CD19CD24hiCD38hi**) ήταν αυξημένος στο αίμα του ομφάλιου λώρου και τα κύτταρα εμφάνισαν μεγαλύτερη δραστηριότητα. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης IgM ανά κύτταρο δημιουργώντας την πιθανότητα ενός καινούριου μηχανισμού των B ρυθμιστικών, καθώς τα IgM είναι αντισώματα τα οποία εμφανίζουν κατασταλτικές ιδιότητες όσον αφορά την δράση των T κυττάρων. Επίσης οι πληθυσμοί μεταξύ των δύο δειγμάτων εμφάνισαν πανομοιότυπο φαινότυπο (**IgMhiIgDhiCD5+CD10+CD27-**) αλλά στα δείγματα των εγκύων υπήρξε μείωση της έκφρασης του **CD22** και **CD73**. Η μείωση του CD22 δείχνει ότι τα B ρυθμιστικά αυτά έχουν μικρότερο κατώφλι ενεργοποίησης κάτι που μπορεί να αποτελεί μηχανισμό προστασίας του νεογνού, για την μετέπειτα έκθεση του στο περιβάλλον, για την αποφυγή υπεραντίδρασης στα νέα αντιγόνα[61].

Συγγραφέας	Παρουσία Breg	Πληθυσμός Breg	Επίδραση στο κλινικό αποτέλεσμα	Σχόλιο
Esteve-Solé et al. (61)	Αυξημένη	CD19+CD24hiCD38hi	Θετική έκβαση	Παρατηρήθηκε ότι σε υγιής εγκύους ο αριθμός των Breg, σε αναλογία με τους άλλους πληθυσμούς B κυττάρων, στο αίμα του ομφάλιου λώρου ήταν αυξημένος συγκριτικά με υγιής ενήλικες.
Busse et al. (62)	Μειωμένη	CD38hiCD24hiCD19+, CD1dhiCD5+CD19+	Πρόωρος τοκετός	Παρατηρήθηκε αυξημένος αριθμός B κυττάρων αλλά μειωμένα επίπεδα Breg σε γυναίκες με πρόωρους τοκετούς σε αντίθεση με υγιής εγκύους, λίγο πριν την γέννα με καισαρική.
S. Danaii, et al. (63)	Μειωμένη	IL-10+ CD19+	Πολλαπλές αποβολές	Παρατηρήθηκε ότι μειωμένος αριθμός Breg, και της κυτοκίνης που παράγουν (IL-10), μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την κύηση. Επίσης, παρατηρήθηκε και αρνητική συσχέτιση των κυττάρων αυτών με τα επίπεδα αντισωμάτων IgG σε γυναίκες με πολλαπλές αποβολές.
L. Koushaeian, et al. (64)	Μειωμένη	CD19+ IL-10+	Πολλαπλές αποτυχημένες εμφυτεύσεις	Παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση του αριθμού των Breg και του αριθμού των αποτυχημένων εμφυτεύσεων.
Lima et al. (65)	Αυξημένη	CD24hiCD38hi	Φυσιολογική κύηση	Παρατηρήθηκε ότι ενώ ο συνολικός αριθμός των B κυττάρων μειωνόταν από το 3 ^ο εξάμηνο της κύησης ακόμα και μετά τον τοκετό, ο αριθμός των Breg εμφανίστηκε αυξημένος μετά τον τοκετό σε σχέση με υγιής μη εγκύους.
Rolle et al. (66)	Μειωμένη	CD19+CD24hiCD27+	Αυτόματη αποβολή	Παρατηρήθηκε ότι ενώ σε υγιής εγκύους ο αριθμός των Breg ήταν σημαντικά αυξημένος, γυναίκες με αυτόματες αποβολές εμφάνιζαν αριθμούς αυτών των κυττάρων παρόμοιους με αυτών από μη εγκύους υγιής γυναίκες.

Πίνακας 2. Σύνοψη αποτελεσμάτων ερευνών σχετικές με την παρουσία B reg κυττάρων στην κύηση.

Κεφάλαιο 6

6 Σύνοψη

Σε αυτή την βιβλιογραφική ανασκόπηση μελετήθηκαν τα είδη των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που συνεισφέρουν στην δημιουργία ενός μικροπεριβάλλοντος ανοχής μεταξύ μητέρας και εμβρύου στο ενδομήτριο. Τα κύτταρα τα οποία συζητήθηκαν εκτενώς ήταν τα T και B ρυθμιστικά κύτταρα, τα οποία φαίνεται ότι βοηθάν τους υπόλοιπους τύπους κυττάρων στην δημιουργία και διατήρηση μια ισορροπίας, όπου τα φλεγμονώδη σήματα υπερνικούνται από τα σήματα ανοχής. Μαζί με αυτά τα κύτταρα υπάρχουν και παράγοντες που προέρχονται από πατρική, μητρική και εμβρυϊκή προέλευση οι οποίοι συμμετέχουν στο μικροπεριβάλλον της μήτρας. Η πατρική συμβολή έρχεται από τα πρώτα στάδια με τα σπερματικά υγρά τα οποία περιέχουν παράγοντες όπως ο TGFβ και πατρικά αντιγόνα, για ωρίμανση. Η εμβρυϊκή τροφοβλάστη συνεισφέρει με την έκφραση των ανοσοκατασταλτικών μορίων HLA-G και HLA-E, γαλεκτίνες και PD-L1. Με την σειρά της η μητέρα παρουσιάζει έναν πληθυσμό κυττάρων της ανοσίας τα οποία παραμένουν σε έναν ανενεργό φαινότυπο και δεν παράγουν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Όσον αφορά τα Treg από τις σχετικές έρευνες, υπάρχουν αρκετοί υποψήφιοι μηχανισμοί με τους οποίους ενεργοποιούνται και στην συνέχεια φτάνοντας στο σημείο της διεπαφής αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα της ανοσίας, είτε μέσω σύνδεσης με αυτά με το μονοπάτι PD-1/PD-L1 είτε μέσω της παραγωγής κυτταροκινών όπως η IL-10 ή και με διαλυτά μόρια HLA-G. Επίσης, φαίνεται ότι υπάρχει κάποια ρύθμιση στην οποία υποβάλλονται κατά την διάρκεια της κύησης η οποία αν διαταραχθεί μπορεί να οδηγήσει σε επιπλοκές της εγκυμοσύνης. Το ίδιο ισχύει και για τα B ρυθμιστικά κύτταρα, τα οποία έχουν μελετηθεί ακόμα λιγότερο, και τα οποία με την σειρά τους εμφανίζουν διαφορετικούς μηχανισμούς με τους οποίους ρυθμίζουν τις αναλογίες μεταξύ των άλλων πληθυσμών για να επιτευχθεί η κατάλληλη ισορροπία. Ακόμα δεν είναι απόλυτα γνωστός ο ακριβής τρόπος με τον οποίο μπορούν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα μιας κύησης και θα είναι σημαντικό στο μέλλον μέσα από περαιτέρω μελέτες να αποσαφηνιστούν οι μηχανισμοί λειτουργίας τους με σκοπό την παροχή κατάλληλων θεραπειών στους ασθενείς.

Βιβλιογραφία

1. Carp HJ, Selmi C, Shoenfeld Y. The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. *J Autoimmun.* 2012; 38(2–3):J266–74. [PubMed: 22284905]
2. Bonney EA, Brown SA. To drive or be driven: the path of a mouse model of recurrent pregnancy loss. *Reproduction (Cambridge, England).* 2014; 147(5):R153–67.
3. Lissauer D, Piper K, Goodyear O, Kilby MD, Moss PA. Fetal-specific CD8+ cytotoxic T cell responses develop during normal human pregnancy and exhibit broad functional capacity. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950).* 2012; 189(2):1072–80.
4. Anahtar MN, Byrne EH, Doherty KE, Bowman BA, Yamamoto HS, Soumillon M, et al. Cervicovaginal bacteria are a major modulator of host inflammatory responses in the female genital tract. *Immunity.* 2015; 42(5):965–76. [PubMed: 25992865]
5. Yarbrough VL, Winkle S, Herbst-Kralovetz MM. Antimicrobial peptides in the female reproductive tract: a critical component of the mucosal immune barrier with physiological and clinical implications. *Human Reproduction Update.* 2015; 21(3):353–377. [PubMed: 25547201]
6. Sheba Anin, Gill Vince & Siobhan Quenby. Trophoblast invasion. Pages 169-174 | Published online: 03 Jul 2009
7. Papuchova H, Meissner TB, Li Q, Strominger JL, Tilburgs T. The Dual Role of HLA-C in Tolerance and Immunity at the Maternal-Fetal Interface. *Front Immunol.* (2019) 10:2730. doi: 10.3389/fimmu.2019.02730
8. Tilburgs T, Scherjon SA, van der Mast BJ, Haasnoot GW, Versteeg VDVMM, Roelen DL, et al. Fetal-maternal HLA-C mismatch is associated with decidual T cell activation and induction of functional T regulatory cells. *J Reprod Immunol.* (2009) 82:148–57. doi: 10.1016/j.jri.2009.05.003
9. Abrahams VM, Straszewski-Chavez SL, Guller S, Mor G. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol Hum Reprod.* (2004) 10:55–63. doi: 10.1093/molehr/gah006
10. Yeung AW, Terentis AC, King NJ, Thomas SR. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in health and disease. *Clin Sci.* (2015) 129:601–72. doi: 10.1042/CS20140392
11. Balogh A, Toth E, Romero R, Parej K, Csala D, Szenasi NL, et al. Placental galectins are key players in regulating the maternal adaptive immune response. *Front Immunol.* (2019) 10:1240. doi: 10.3389/fimmu.2019.01240
12. Sappenfield, E.; Jamieson, D.J.; Kourtis, A.P. Pregnancy and Susceptibility to Infectious Diseases. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2013, 2013, 1–8.

13. Nair, R.R.; Verma, P.; Singh, K. Immune-endocrine crosstalk during pregnancy. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2017, 242
14. Pang, G.; Buret, A.; Batey, R.T.; Chen, Q.Y.; Couch, L.; Cripps, A.; Clancy, R. Morphological, phenotypic and functional characteristics of a pure population of CD56+ CD16- CD3- large granular lymphocytes generated from human duodenal mucosa. *Immunology* 1993, 79, 498–505
15. Hanna, J.; Goldman-Wohl, D.; Hamani, Y.; Avraham, I.; Greenfield, C.; Natanson-Yaron, S.; Prus, D.; Cohen-Daniel, L.; Arnon, T.I.; Manaster, I.; et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat. Med.* 2006, 12,
16. Racicot, K.; Kwon, J.Y.; Aldo, P.; Silasi, M.; Mor, G. Understanding the complexity of the immune system during pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2014
17. Bonney, E.A. Immune Regulation in Pregnancy: A Matter of Perspective? *Obstet. Gynecol. Clin. N. Am.* 2016
18. Zenclussen, A.C. Adaptive Immune Responses During Pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2013, 69
19. Thornton AM, Shevach EM. CD4 + CD25 + immunoregulatory T Cells Suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* (1998)
20. Nguyen, T.G.; Ward, C.M.; Morris, J.M. To B or not to B cells-mediate a healthy start to life. *Clin. Exp. Immunol.* 2013
21. Pia̧tosa, B.; Wolska-Kus'nierz, B.; Pac, M.; Siewiera, K.; Gałkowska, E.; Bernatowska, E. B cell subsets in healthy children: Reference values for evaluation of B cell maturation process in peripheral blood. *Cytom. Part B Clin. Cytom.* 2010
22. Fettke, F.; Schumacher, A.; Canellada, A.; Toledo, N.; Bekeredjian-Ding, I.; Bondt, A.; Wuhler, M.; Costa, S.-D.; Zenclussen, A.C. Maternal and Fetal Mechanisms of B Cell Regulation during Pregnancy: Human Chorionic Gonadotropin Stimulates B Cells to Produce IL-10 While Alpha-Fetoprotein Drives Them into Apoptosis. *Front. Immunol.* 2016
23. Guerin LR, Prins JR, Robertson SA. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? *Hum Reprod Update.* (2009)
24. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic selftolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alphachains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* (1995)
25. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity.* (2005)
26. Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol.* (2003)

27. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev.* (2001)
28. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3 + T regulatory cells. *J Immunol.* (2010)
29. Dunussi-Joannopoulos K, LaBranche TP, Ryan MS, Medley QG, Keegan SP, Collins M, et al. Enhanced GITR/GITRL interactions augment IL-27 expression and induce IL-10-producing Tr-1 like cells. *Eur J Immunol.* (2012)
30. Shevach EM, Thornton AM. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol Rev.* (2014)
31. Liu S, Diao L, Huang C, Li Y, Zeng Y, Kwak-Kim JYH. The role of decidual immune cells on human pregnancy. *J Reprod Immunol.* (2017)
32. Kallikourdis M, Betz AG. Periodic accumulation of regulatory T cells in the uterus: Preparation for the implantation of a semi-allogeneic fetus? *PLoS ONE.* (2007)
33. Hönig A, Rieger L, Kapp M, Sütterlin M, Dietl J, Kämmerer U. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in invasive extravillous trophoblast supports role of the enzyme for materno-fetal tolerance. *J Reprod Immunol.* (2004)
34. Habicht A, Dada S, Jurewicz M, Fife BT, Yagita H, Azuma M, et al. A link between PDL1 and T regulatory cells in fetomaternal tolerance. *J Immunol.* (2007) 179:5211–19. doi: 10.4049/jimmunol.179.8.5211
35. Mauri, C.; Menon, M. Human regulatory B cells in health and disease: Therapeutic potential. *J. Clin. Investig.* 2017
36. Rosser, E.C.; Mauri, C. Regulatory B cells: Origin, phenotype, and function. *Immunity* 2015
37. Mauri, C.; Menon, M. The expanding family of regulatory B cells. *Int. Immunol.* 2015
38. Flores-Borja, F.; Bosma, A.; Ng, D.; Reddy, V.; Ehrenstein, M.R.; Isenberg, D.A.; Mauri, C. CD19+CD24hiCD38hiB Cells Maintain Regulatory T Cells While Limiting TH1 and TH17 Differentiation. *Sci. Transl. Med.* 2013
39. Shen, P.; Fillatreau, S. Suppressive functions of B cells in infectious diseases. *Int. Immunol.* 2015
40. Soares, R.R.; Antinarelli, L.M.R.; Abramo, C.; Macedo, G.C.; Coimbra, E.S.; Scopel, K.K.G. What do we know about the role of regulatory B cells (Breg) during the course of infection of two major parasitic diseases, malaria and leishmaniasis? *Pathog. Glob. Health* 2017
41. Jiao, Y.; Wang, X.; Zhang, T.; Lijun, S.; Wang, R.; Li, W.; Ji, Y.; Wu, H.; Liu, C. Regulatory B cells correlate with HIV disease progression. *Microbiol. Immunol.* 2014
42. Guzman-Genuino, R.M.; Diener, K.R. Regulatory B cells in pregnancy: Lessons from autoimmunity, graft tolerance, and cancer. *Front. Immunol.* 2017

43. Muzzio, D.; Zygmunt, M.; Jensen, F. The role of pregnancy-associated hormones in the development and function of regulatory B cells. *Front. Endocrinol.* 2014
44. Ray A, Wang L, Dittel BN. IL-10-independent regulatory B-cell subsets and mechanisms of action. *Int Immunol* (2015)
45. Bodhankar S, Galipeau D, Vandenbark AA, Offner H. PD-1 interaction with PD-L1 but not PD-L2 on B-cells mediates protective effects of estrogen against EAE. *J Clin Cell Immunol* (2013)
46. Minagawa R, Okano S, Tomita Y, Kishihara K, Yamada H, Nomoto K, et al. The critical role of Fas-Fas ligand interaction in donor-specific transfusion-induced tolerance to H-Y antigen. *Transplantation* (2004)
47. Jensen, F.; Muzzio, D.; Soldati, R.; Fest, S.; Zenclussen, A.C. Regulatory B10 cells restore pregnancy tolerance in a mouse model. *Biol. Reprod.* 2013
48. Chakravarty, E.F.; Murray, E.R.; Kelman, A.; Farmer, P.; Saji, F.; Samejima, Y.; Kamiura, S.; Koyoma, M.; Boothby, L.; Doering, P.; et al. Pregnancy outcomes after maternal exposure to rituximab. *Blood* 2011
49. Mjösberg J, Berg G, Jenmalm MC, Ernerudh J. FOXP3⁺ regulatory T cells and T Helper 1, T Helper 2, and T Helper 17 cells in human early pregnancy Decidua¹. *Biol Reprod.* (2010)
50. Robertson SA, Care AS, Moldenhauer LM. Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. *J Clin Invest.* (2018)
51. Jasper MJ, Tremellen KP, Robertson SA. Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue. *Mol Hum Reprod.* (2006)
52. Kallikourdis M, Betz AG. Periodic accumulation of regulatory T cells in the uterus: Preparation for the implantation of a semi-allogeneic fetus? *PLoS ONE.* (2007)
53. Zare M, Doroudchi M, Ghareh-Fard B. Altered Frequencies of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ and CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Regulatory T Cells in Pre-eclampsia. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2018 Dec 2;17(6):540-547. PMID: 30644698.
54. Luo L, Zeng X, Huang Z, Luo S, Qin L, Li S. Reduced frequency and functional defects of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-} regulatory T cells in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion. *Reprod Biol Endocrinol.* 2020 Jun 10;18(1):62. doi: 10.1186/s12958-020-00619-7. PMID: 32522204; PMCID: PMC7285476.
55. Tsuda S, Zhang X, Hamana H, Shima T, Ushijima A, Tsuda K, Muraguchi A, Kishi H, Saito S. Clonally Expanded Decidual Effector Regulatory T Cells Increase in Late Gestation of Normal Pregnancy, but Not in Preeclampsia, in Humans. *Front Immunol.* 2018 Aug 24;9:1934. doi: 10.3389/fimmu.2018.01934. PMID: 30197648; PMCID: PMC6118230.
56. Zare M, Namavar Jahromi B, Ghareh-Fard B. Analysis of the frequencies and functions of CD4⁺CD25⁺CD127^{low/neg}, CD4⁺HLA-G⁺, and CD8⁺HLA-G⁺ regulatory

- T cells in pre-eclampsia. *J Reprod Immunol.* 2019 Jun;133:43-51. doi: 10.1016/j.jri.2019.06.002. Epub 2019 Jun 21. PMID: 31255887.
57. Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fazekas de St Groth B, Nanan R. Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J Immunol.* 2009 Dec 1;183(11):7023-30. doi: 10.4049/jimmunol.0901154. Epub 2009 Nov 13. PMID: 19915051.
 58. Wang SC, Li YH, Piao HL, Hong XW, Zhang D, Xu YY, Tao Y, Wang Y, Yuan MM, Li DJ, Du MR. PD-1 and Tim-3 pathways are associated with regulatory CD8+ T-cell function in decidua and maintenance of normal pregnancy. *Cell Death Dis.* 2015 May 7;6(5):e1738. doi: 10.1038/cddis.2015.112. PMID: 25950468; PMCID: PMC4669692.
 59. Jiang L, Tang C, Gong Y, Liu Y, Rao J, Chen S, Qu W, Wu D, Lei L, Chen L. PD-1/PD-L1 regulates Treg differentiation in pregnancy-induced hypertension. *Braz J Med Biol Res.* 2018;51(8):e7334. doi: 10.1590/1414-431x20187334. Epub 2018 May 28. PMID: 29846432; PMCID: PMC5999066.
 60. Wang WJ, Salazar Garcia MD, Deutsch G, Sung N, Yang X, He Q, Jubiz G, Bilal M, Dambaeva S, Gilman-Sachs A, Beaman K, Kwak-Kim J. PD-1 and PD-L1 expression on T-cell subsets in women with unexplained recurrent pregnancy losses. *Am J Reprod Immunol.* 2020 May;83(5):e13230. doi: 10.1111/aji.13230. Epub 2020 Mar 23. PMID: 32086851.
 61. Esteve-Solé A, Teixidó I, Deyà-Martínez A, Yagüe J, Plaza-Martín AM, Juan M, Alsina L. Characterization of the Highly Prevalent Regulatory CD24hiCD38hi B-Cell Population in Human Cord Blood. *Front Immunol.* 2017 Mar 7;8:201. doi: 10.3389/fimmu.2017.00201. PMID: 28326080; PMCID: PMC5339297.
 62. Busse M, Campe KJ, Redlich A, Oettel A, Hartig R, Costa SD, Zenclussen AC. Regulatory B Cells Are Decreased and Impaired in Their Function in Peripheral Maternal Blood in Pre-term Birth. *Front Immunol.* 2020 Mar 20;11:386. doi: 10.3389/fimmu.2020.00386. PMID: 32265904; PMCID: PMC7099879.
 63. Danaii S, Ghorbani F, Ahmadi M, Abbaszadeh H, Koushaeian L, Soltani-Zangbar MS, Mehdizadeh A, Hojjat-Farsangi M, Kafil HS, Aghebati-Maleki L, Yousefi M. IL-10-producing B cells play important role in the pathogenesis of recurrent pregnancy loss. *Int Immunopharmacol.* 2020 Oct;87:106806. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106806. Epub 2020 Jul 18. PMID: 32693358.
 64. Koushaeian L, Ghorbani F, Ahmadi M, Eghbal-Fard S, Zamani M, Danaii S, Yousefi B, Jadidi-Niaragh F, Hamdi K, Yousefi M. The role of IL-10-producing B cells in repeated implantation failure patients with cellular immune abnormalities. *Immunol Lett.* 2019 Oct;214:16-22. doi: 10.1016/j.imlet.2019.08.002. Epub 2019 Aug 20. PMID: 31442543.

65. Lima J, Martins C, Leandro MJ, Nunes G, Sousa MJ, Branco JC, Borrego LM. Characterization of B cells in healthy pregnant women from late pregnancy to post-partum: a prospective observational study. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2016 Jun 6;16(1):139. doi: 10.1186/s12884-016-0927-7. PMID: 27267973; PMCID: PMC4895979.
66. Rolle L, Memarzadeh Tehran M, Morell-García A, Raeva Y, Schumacher A, Hartig R, Costa SD, Jensen F, Zencclussen AC. Cutting edge: IL-10-producing regulatory B cells in early human pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2013 Dec;70(6):448-53. doi: 10.1111/aji.12157. Epub 2013 Oct 10. PMID: 24118333.

